

総論の部

緒言

新規医薬品開発における非臨床試験は、対象とする疾患に対する候補化合物の有効性の確認、およびヒト試験に向けた安全性の担保を目的としており、種々の薬理試験、体内動態試験、安全性試験が行われる。そのうち動態試験は、薬物の吸収 (Absorption)、分布 (Distribution)、代謝 (Metabolism)、排泄 (Excretion) の動態に関する各プロセスを明らかにすることで、その有効性・安全性に科学的根拠を与えることを目的としている。また、安全性試験のデータと併せて評価することにより、動物における薬理試験の条件設定や結果の解釈に役立つものとなる。一方、臨床現場では複数の薬物を処方することが多く、薬物間相互作用により重篤な副作用の発現、治療効果の減弱などの有害事象が生じる可能性があることから、必要に応じて前臨床段階で薬物間相互作用に関する試験が実施される。最終的に、これらの非臨床試験での結果を総合的に判断し、ヒトにおける有効性および安全性を予測することによって、臨床試験へとスムーズに進むことが可能となる。

薬物の体内動態に関する速度論的パラメータ (Pharmacokinetic (PK) パラメータ) として、静脈内投与試験では全身クリアランス (CL_{tot}) や分布容積 (Vd) が、経口投与試験では血中濃度時間曲線下面積 (AUC_{po}) や最高血中濃度 (C_{max}) 等が求められる。経口剤開発において最も重要なパラメータである生物学的利用率 (BA) の算出には、両試験のデータが必要である。通常、マウスやラット等の小動物では、静脈内投与と経口投与試験はそれぞれ別の個体を用いて独立して実施されるため、BA は各 PK パラメータの平均値を用いて算出された値となる。イヌやサルなどの大動物の場合は、一つの試験終了後に十分な wash out 期間を設けることで同じ個体での cross over 試験が可能であるが、生理学的に同一な条件下での試験とは言い難い。

ヒトにおいても、経口剤については経口投与試験に加えて静脈内投与試験を実施し、BA および CL_{tot} や Vd 等の正確な PK パラメータを求めておくことが望ましい。しかし、現在市販されている多くの経口剤では、ヒト静脈内投与試験は実施されていないのが現状である。その理由として、①臨床試験に用いる静脈内注射剤は、無菌製剤として調製するため多大なコストと時間が必要、②静脈内注射では投与後初期の血中濃度が一過的に高くなるため、経口投与による毒性試験では安全性が担保されない、③難溶性の経口剤では溶液としての注射剤の調製が困難、などが挙げられる。欧米では、この問題の解決法の一つとして、臨床試験において治療用量の経口投与を行い、その血中濃度

がほぼ最高濃度に到達した時点で、同薬の ^{14}C 放射性同位体の標識体をごく微量静脈内に投与する、*iv*MicrodoseTM 試験法が活用されている。この試験では、非標識薬物とその ^{14}C 標識体と同じ体内動態を示すと言う前提のもと、両者の血中濃度を加速器質量分析法 (Accelerated Mass Spectrometer; AMS 法) を用いて分離定量することにより、1回の試験で BA を含む PK パラメータを算出することが可能である¹⁻³⁾。また、静脈内に投与される ^{14}C 標識体の量は通常 tracer レベル (pg レベル以下) と極めて微量であるため、投与後の安全性および注射剤調製時の溶解性等は問題とならない。しかしながら、標識体の作成および AMS 法による試料分析に多大なコストと専用の施設が必要な上、微量とは言えヒトに放射性化合物を投与することに対する抵抗感から、わが国ではほとんど利用されていない。また、*iv*MicrodoseTM 試験は非臨床試験に用いることも可能であるが、やはりコストや時間の問題からその活用例はほとんど報告されていない。

同位体には ^{11}C や ^{14}C 、あるいは ^3H 等の放射性同位体と ^{13}C 、 ^2H 等の安定同位体が存在する。このうち ^2H (重水素) 標識化合物は、新薬開発時に質量分析用の内部標準としてしばしば利用される。すなわち、水素はその ^1H 体が天然で最も多く存在しているが、化合物の一部を ^2H でラベル化 (標識化) することによって、同じサンプル中に元の化合物 (非標識体) と標識体が混合していても、それぞれを分離して定量することが出来る。特に近年、pg/mL レベルの薬物濃度の測定が可能な高感度液体クロマトグラフィー質量分析技術 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS/MS) が開発されており、製薬企業や大学等の研究施設においても、 ^2H 等の安定同位体で標識した化合物を微量投与した後の血中濃度を正確に定量することは十分可能と考えられる⁴⁾。

そこで本研究では、薬物の経口投与とその安定同位体標識体の微量静脈内投与を組み合わせた新たな試験法 (stable isotope-intravenous injection (IV) method ; 安定同位体 *iv* 法) を考案し、薬物の体内動態解析における妥当性と有用性に関して詳細な検討を行った。本方法では、*iv*MicrodoseTM 試験法に比べて、標識化および定量にかかるコストが極めて低い上、放射性化合物を用いないことから通常の施設で安全に実施することが出来るため、実験動物を用いた非臨床試験への応用が期待される。一方、非臨床試験においては、動物愛護の問題から、用いる動物数の削減 (Reduction)、試験方法の制限 (Refinement; 苦痛の軽減)、動物試験に代わる代替法の利用 (Replacement) の 3R の原則が提唱されている⁵⁾。安定同位体 *iv* 法を用いることにより、経口および静脈内投与試験を別々に行う従来法に比べて、必要な動物数は 1/2 となる。特に、薬物間相互作用

用を検証する場合には、同様の試験を併用薬投与群と非投与群で行う必要があるため、従来法に比べて有用性は高いと考えられる (Fig. 1)。

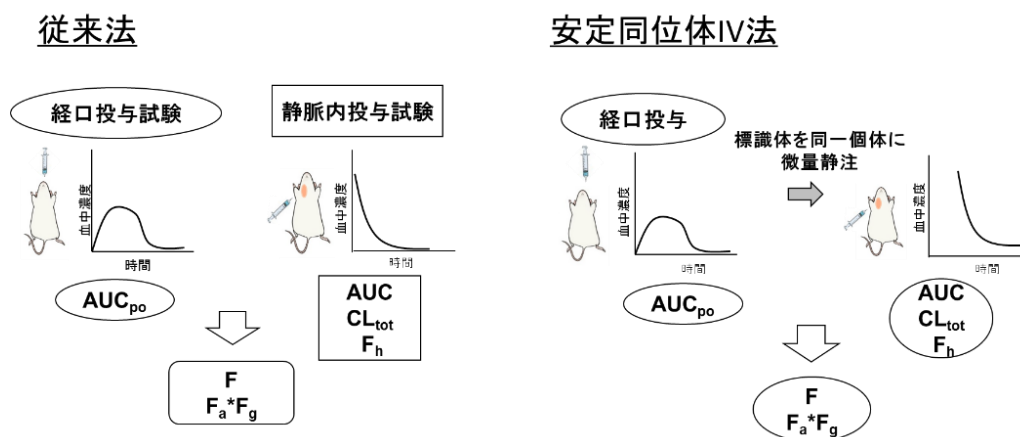


Fig. 1 Comparison of conventional method and stable isotope-IV method to obtain PK parameters.

(AUC; area under the blood concentration-time curve, CL_{tot} ; total clearance, F_h ; hepatic availability, F ; bioavailability, $F_a \cdot F_g$; intestinal availability)

以下、安定同位体 *iv* 法を用いて、薬物の非線形体内動態、薬物間相互作用およびその動物間種差に関して検討した結果を 3 章にわたり論述する。

第1章 安定同位体 iv 法の検証と非線形体内動態の解析

安定同位体 iv 法（以下、特に必要のない場合は「同位体 iv 法」と記す）は、薬物を経口投与した後、最高血中濃度到達時間（ T_{max} ）の前後（少なくとも C_{max} の 1/2 以上の濃度が維持されている時間）に、薬物の一部を重水素等の安定同位体で置換した標識体を微量静脈内に投与（静注）することにより、従来では別々に行われていた経口投与と静脈内投与試験を同時に同一個体で行うことを目的として、新たに考案した手法である。本手法を非臨床動物試験に応用することによって、使用動物の匹数および試験コスト、時間が削減される他、経口投与と静脈内投与後の PK パラメータが同一個体から同時に得られるため、その個体自身の BA 等の算出が可能である。ただし、安定同位体で標識した化合物を用いて動態解析を行う場合、非標識体と標識体が同じ体内動態を示すことが必要不可欠である。例えば、重水素に置換した部分が代謝に関与する部分である場合や、トランスポーターに認識される部分であった場合、重水素標識によって体内動態が変化することが報告されている（同位体効果）^{6,7)}。そのようなケースでは、標識体の体内動態から元の薬物の動態を解析することは困難である。

本章では、まず、同位体 iv 法に用いる標識体の同位体効果の有無を検証することを目的として、ベラパミル (VER) およびテルミサルタン (TEL) の 2 つの薬物について、重水素で置換した標識体の PK パラメータをそれぞれの非標識体と比較した。さらに、TEL は臨床投与量の範囲で、体内動態における非線形性が報告されていることから⁸⁾、同位体 iv 法を用いて TEL の体内動態に関する速度論的な解析を行い、その妥当性および有用性について考察した。

第1節 安定同位体 iv 法の検証

同位体 iv 法では重水素標識体を用いるが、必ずしも重水素標識体が非標識体と同じ体内動態となるとは限らず、同位体効果を示す場合も報告されている^{6,7)}。そこで、まずモデル薬物として VER と TEL を用い、それぞれの重水素標識体 (VER-d6, TEL-d3) の PK パラメータを非標識体と比較した。

1.1-1) ベラパミル重水素標識体を用いた同位体効果の検証

VER は投与後、主として CYP3A4 による肝代謝によって体内から消失することが知られている。そこで VER およびその重水素 6 置換体である VER-d6 (Fig. 2) につい

て、肝ミクロソーム中での代謝安定性、およびラットにおける体内動態の評価を行った。

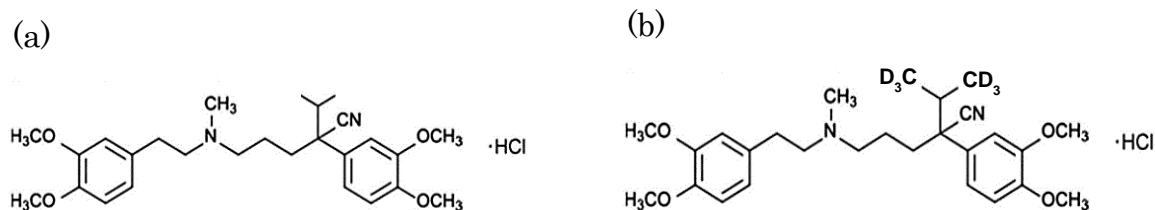


Fig. 2 Chemical structures of (a) VER and (b) VER-d6.

VER および VER-d6 をラット肝ミクロソーム中に添加し、その代謝安定性を調べた結果、Fig. 3 に示す様に、両者の消失はほぼ同様であり (159 ± 2.13 , 162 ± 2.84 p,ol/min/mg protein) 代謝速度には有意な差は認められなかった。本結果より、VER-d6 における重水素標識は VER の代謝に影響を及ぼさないことが示された。

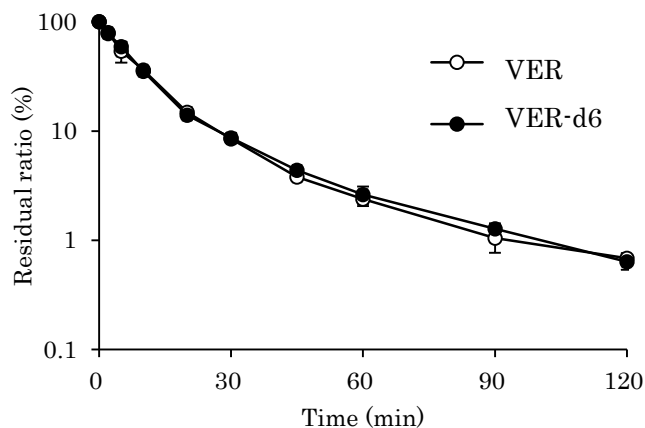


Fig. 3 Effects of deuterium label on the hepatic metabolism of VER in rat liver microsomes *in vitro*.

Residual amounts of VER (open circle) and VER-d6 (closed circle) were monitored for 120 min. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

次に、ラットに VER (0.1 mg/kg) および VER-d6 (0.01 mg/kg) を静脈内投与した時の血中濃度推移を Fig. 4 に、そこから得られた各 PK パラメータを Table 1 に示す。VER と VER-d6 の CL_{tot} 、Vd に有意な差は無く、両者が同じ体内動態を示したことから、VER-d6 には同位体効果が認められないことが確認された。

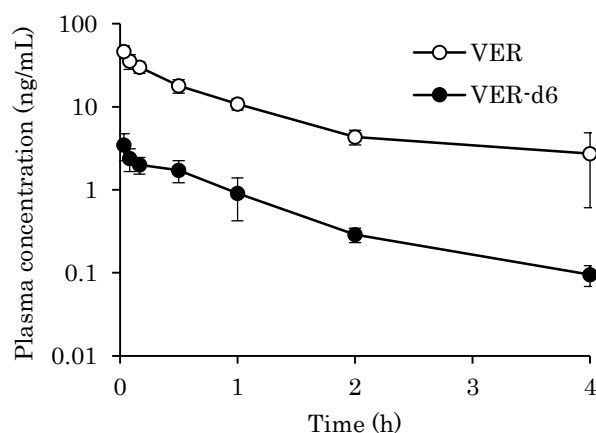


Fig. 4 Plasma concentration of VER and VER-d6 after intravenous administration to rats.

VER (0.1 mg/kg, circle) and VER-d6 (0.01 mg/kg, triangle) were IV administered to rats and their plasma concentrations were monitored. Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

Table 1 PK parameters of VER and VER-d6 after intravenous administration to rats.

| | C_0 (ng/mL) | AUC_{iv} (ng · h/mL) | CL_{tot} (L/h/kg) | Vd (L/kg) |
|--------|------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| VER | 48.4 \pm 8.4 | 38.0 \pm 6.3 | 3.16 \pm 0.56 | 4.17 \pm 1.88 |
| VER-d6 | 4.36 \pm 1.40 | 3.16 \pm 0.6 | 3.81 \pm 0.74 | 3.76 \pm 1.17 |

静脈内投与後の VER-d6 の体内動態が VER と同一であることが確認できたため、次に VER の経口投与が静脈内投与後の VER-d6 の体内動態に影響しないか検証した。VER (1 mg/kg) をラットに経口投与し、最高血中濃度到達時間 (T_{max}) に近い 90 分後に VER-d6 (0.005 mg/kg) を同一個体に静脈内投与した。Fig. 5 に (a) 経口投与後の VER 血中濃度推移、および (b) 90 分後に静脈内投与された VER-d6 血中濃度推移を、Table 2 に得られた PK パラメータを示した。VER 経口投与後に VER-d6 を静脈内投与した時でも、先述した静注試験での CL_{tot} , Vd (Table 1) と同等の値が得られ、経口投

与した VER が静脈内投与後の VER-d6 の体内動態に影響を与えないことが確認された。これらの結果から、同一個体で経口／静脈内投与試験を同時に行うことが可能であると判断された。

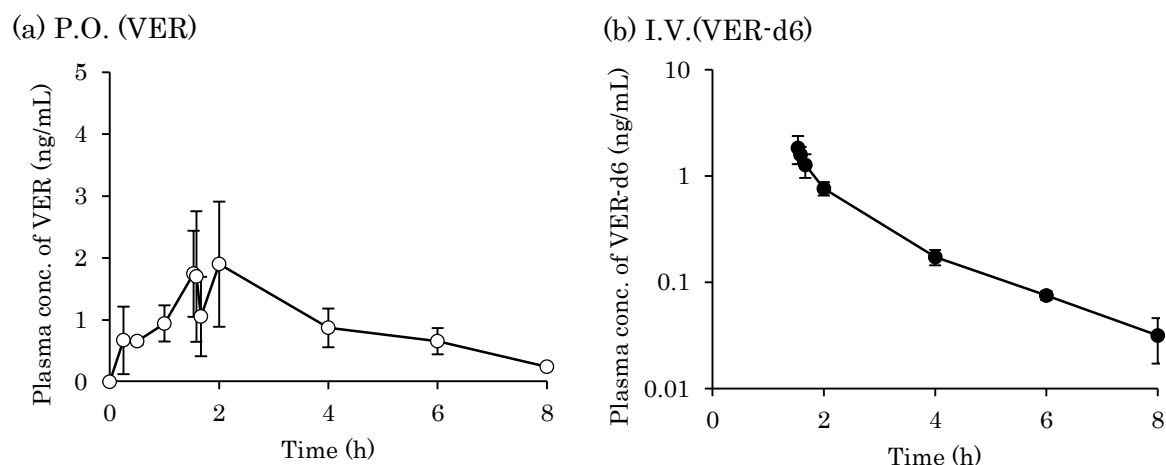


Fig. 5 Plasma concentration of VER (a) and VER-d6 (b) after their oral and intravenous administration to rats, respectively.

Plasma concentration of VER was measured after its oral administration (1.0 mg/kg) to rats, and that of VER-d6 (0.005 mg/kg) was monitored after IV administration to rats at 90 minutes after oral administration of VER.

Table 2 PK parameters of VER and VER-d6 after oral and intravenous administration to rats.

| P.O. (VER) | | I.V. (VER-d6) | |
|----------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| C_{max} (ng/mL) | AUC_{po} (ng · h/mL) | CL_{tot} (L/h/kg) | Vd (L/kg) |
| 2.26 ± 0.78 | 7.19 ± 2.02 | 3.02 ± 0.31 | 3.84 ± 1.02 |

1.1-2) テルミサルタン重水素標識体を用いた同位体効果の検証

消化管から吸収されて門脈に移行した TEL は、取り込み型の SLC トランスポーター

一である OATP1B3 (Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3) を介して肝細胞に取り込まれた後、細胞内でグルクロン酸抱合を受け、P-gp (P-glycoprotein) や BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), MRP2 (multidrug resistance - associated protein 2) などの排出型トランスポーターによって胆汁中に排泄される⁹⁾。この様な TEL の複雑な体内動態を、重水素標識体を用いた同位体 *iv* 法で解析するため、まず TEL の重水素 3 置換体である TEL-d3 (Fig. 6(b)) が TEL と同様の体内動態を示すか検証した。用いて同位体効果の有無を検証した。

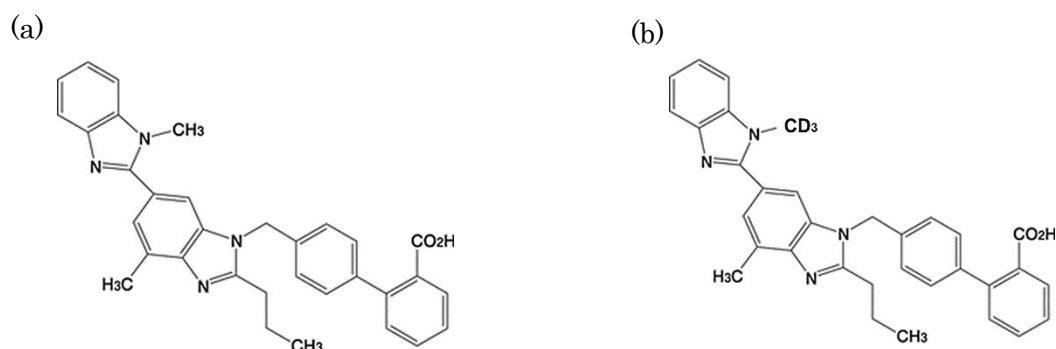


Fig. 6 Chemical structures of (a) TEL and (b) TEL-d3.

ラットに TEL と TEL-d3 を同時に静脈内に投与した後の、それぞれの血中濃度推移を Fig. 7 に、また血中濃度より算出した両化合物の PK パラメータを Table 3 に示す。本検討では、TEL の体内動態に非線形性が認められることを考慮し、TEL の投与量に関して高投与量群 (1 mg/kg) と低投与量群 (0.005mg/kg) の 2 群を設定し、それぞれの投与量での解析を行った。なお、TEL-d3 の投与量は両群とも 0.005mg/kg とした。Fig. 7 より明らかなように、TEL の血中濃度推移は両投与量群で異なっており、低投与量群では CL_{tot} が高投与量群の 6 倍程度に上昇した。Vd も低投与量群で高くなる傾向が認められたが、両群の Vd には統計学的な有意差は検出されなかったことから、高投与量で CL_{tot} が低くなった理由として TEL の消失過程に飽和が生じたものと推察された。また、TEL-d3 の PK パラメータはその投与量が同じであるにもかかわらず TEL 高投与量群と低投与量群で異なり、 CL_{tot} は TEL 高投与量群で低く、両群とも TEL とほぼ同じ値となった。これは、TEL-d3 は体内動態的に TEL と区別されない (同位体効果は無い) ことを意味しており、その PK パラメータを TEL の動態に関するパラメータとして取り扱うことの妥当性を示すものと考えられる。

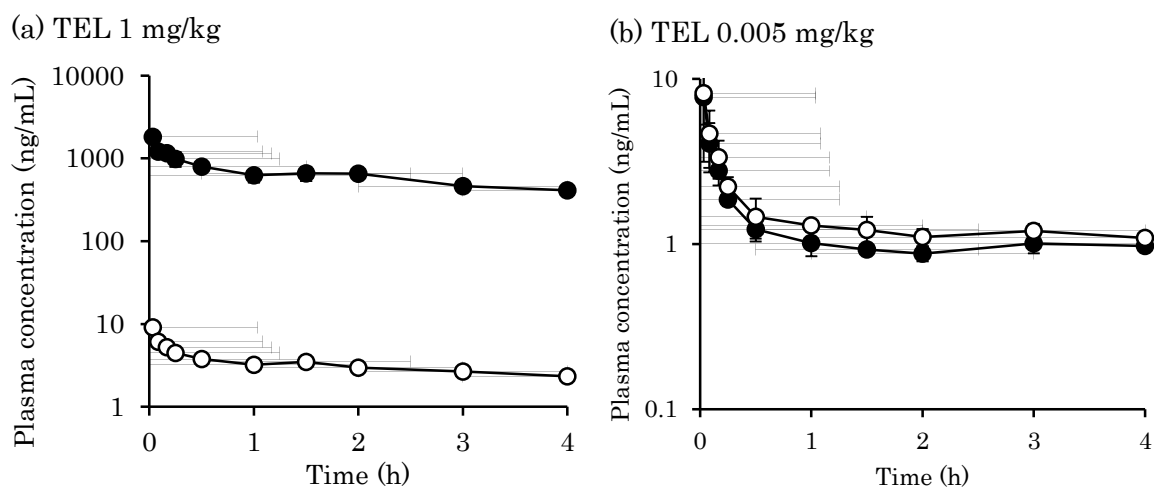


Fig. 7 Plasma concentration of TEL (closed circle) and TEL-d3 (open circle) in rats after intravenous administration of (a) TEL (1.0 mg/kg) with TEL-d3 (0.005 mg/kg) or (b) TEL (0.005 mg/kg) with TEL-d3 (0.005 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SD (n=3).

Table 3 PK parameters of intravenously administered TEL and TEL-d3 to rats.

| | TEL | | TE-d3 | |
|---------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|
| | 1.0 mg/kg | 0.005 mg/kg | With 1.0 mg/kg of TEL | With 0.005 mg/kg of TEL |
| CL_{tot} (L/h/kg) | 0.287 ± 0.011 | 1.79 ± 0.16 | 0.210 ± 0.046 | 1.51 ± 0.24 |
| Vd (L/kg) | 1.03 ± 0.04 | 1.78 ± 0.72 | 1.18 ± 0.09 | 1.57 ± 0.17 |

High TEL-dose group received 1.0 mg/kg of TEL with 0.005 mg/kg of TEL-d3 and low TEL-dose group received 0.005 mg/kg of TEL with the same amount of TEL-d3. CL_{tot} and Vd were not significantly different from those of TEL-d3 both at high and low dose.

第2節 非線形体内動態の解析

薬物投与後、ADME のいずれかの過程に飽和が生じた場合その体内動態は非線形となる¹⁰⁻¹³。例えば、投与量の増加に伴って肝臓中薬物濃度が上昇し肝代謝酵素に飽和が生じた場合には、肝クリアランスが低下し血中からの薬物の消失が遅延する。また、吸収や排泄過程に関与する薬物トランスポーターが飽和した場合には、BA や排泄クリアランスが投与量によって変化し、非線形な動態を示す。このような薬物では、その血中濃度レベルが投与量に比例せず、また、しばしば大きな個体間差が認められるため、有効血中濃度を維持するための用量設定が困難となる。臨床におけるリスクを低減するため、非臨床段階で非線形性が認められた候補化合物については、そのメカニズムを明らかにし、ヒトにおける非線形の可能性を予測しておく必要がある^{14, 15}。

第1節において TEL の CL_{tot} が投与量に依存して変化したことからも明らかな様に、TEL は臨床投与量の範囲内で血中濃度推移が非線形となることが報告されている^{16, 17}。TEL の非線形性については、これまでに分子イメージング技術の一つである PET (Positron Emission Tomography) を用いた研究がいくつか行われている。Kataoka らは、放射性同位体である ^{11}C で標識化した TEL (^{11}C -TEL) をラットに微量経口投与し、非標識の TEL を併用投与した時の ^{11}C の消化管および肝臓中濃度を観察することで、吸収過程および肝取り込み過程の非線形性を明らかにした¹⁸。また、Takashima らの研究グループも同じく PET を用いた検討を行っており、 ^{11}C -TEL のラット静脈内投与実験から、高投与量では肝取り込みクリアランスが低下し、血中曝露が増加することを報告している¹⁹。これらの研究は、薬物の体内動態における非線形性の要因を明らかにするという点で極めて重要であるものの、前臨床段階で多くの候補化合物に対して同様な検討を実施することは難しい。

そこで本節では、同位体 *iv* 法を用いて TEL の体内動態の非線形性の解析を行い、本手法の応用の可能性について考察を試みた。

1.2-1) テルミサルタン経口投与後の体内動態の非線形性

TEL の体内動態が非線形となるメカニズムを明らかにするため、TEL の投与量を 0.1, 2, 6, 20 mg/kg とした 4 群のラットを準備し、各投与量の TEL をラットに経口投与した。その 90 分後に微量の TEL-d3 (0.005 mg/kg) を静脈内投与し、両者の血中濃度を LC/MS/MS を用いて分離定量した結果を Fig. 8 に示した。また、経口投与後の TEL の血中濃度推移から台形公式により血中濃度時間曲線下面積 ($AUC_{po, 0-8h}$) を求め、

投与量との関係性を Table 4 および Fig. 9 に示した。

経口投与後の AUC_{po} は以下の式で表される。

$$AUC_{po} = \frac{\text{Dose} \cdot F}{CL_{tot}} \quad (1)$$

なお、 F は経口投与後の生物学的利用率 (BA) の値を表している。体内動態が常に線形となる薬物では、 F および CL_{tot} は投与量によらず一定であるため、 AUC_{po} は投与量に比例し、 AUC_{po}/Dose は投与量に関係なく一定の値となる。しかし、Fig. 8(a) および Table 4 から明らかなように、TEL 経口投与後の AUC_{po} は投与量に比例せず、 AUC_{po}/Dose は投与量の増加とともに上昇した。TEL の AUC_{po} および AUC_{po}/Dose と投与量との関係を Fig. 9 に示した。 AUC_{po} は投与量に対して直線的に上昇せず、その関係はシグモイド形の曲線となった (Fig.9(a))。また、Fig. 9(b) において、0.1 mg/kg から 6 mg/kg の投与量では AUC_{po}/Dose は増加し、6 mg/kg から 20 mg/kg にかけては低下したことから、TEL 経口投与後の AUC_{po}/Dose は、比較的低用量では正の非線形性を、また、高投与量側では負の非線形性を示すことが明らかとなった。以上の結果より、TEL の体内動態には飽和を生じる複数の過程が関与しており、それらのバランスで複雑な非線形性を示すものと推察された。

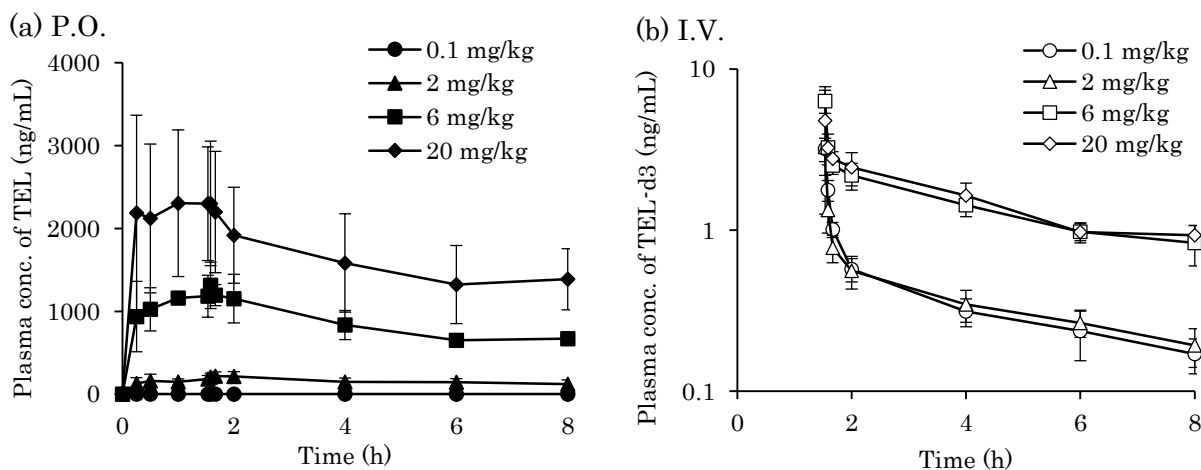


Fig. 8 Plasma concentration of (a) orally administered TEL at the dose of 0.1, 2.0, 6.0, or 20 mg/kg and (b) intravenously administered TEL-d3 at the dose of 0.005 mg/kg.

TEL-d3 was injected at 90 min after oral administration of TEL.

Table 4 AUC_{po} and AUC_{po}/Dose of orally administered TEL at each dose.

| Dose | 0.1 mg/kg | 2.0 mg/kg | 6.0 mg/kg | 20 mg/kg |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| AUC _{po} (ng · h/mL) | 18.6 ± 1.4 | 1245 ± 307 | 6852 ± 658 | 13251 ± 4506 |
| AUC _{po} /Dose (kg · h/L) | 0.19 ± 0.01 | 0.62 ± 0.15 | 1.14 ± 0.11 | 0.66 ± 0.23 |

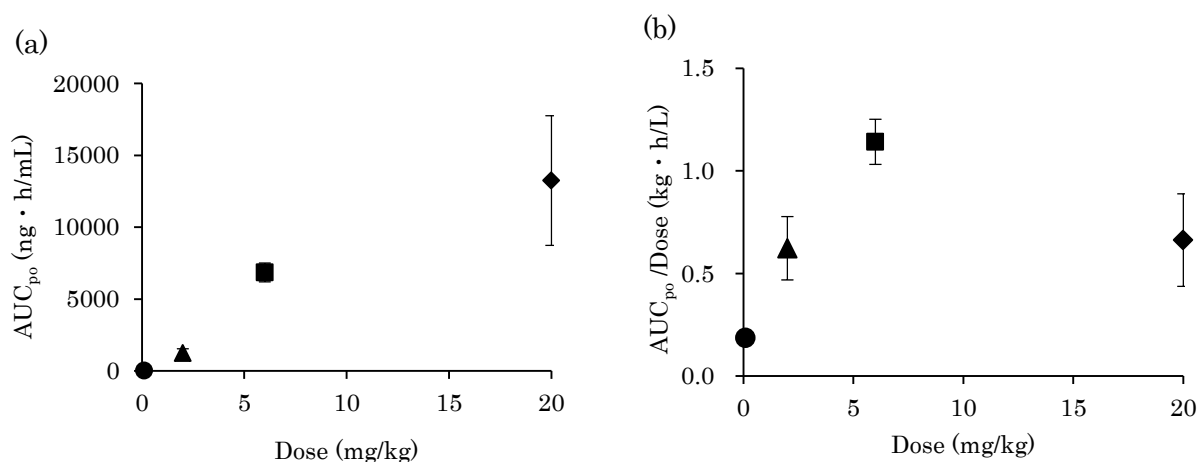


Fig. 9 Relationship between (a) Dose and AUC_{po} and (b) Dose and AUC_{po}/Dose. Data are expressed as mean ± SD (n=4).

1.2-2) 安定同位体 *iv* 法による速度論的解析

一方、静脈内投与後の TEL-d3 の血中濃度推移は、TEL の経口投与量によって異なり、特に 2 mg/kg から 6 mg/kg に増加した際に著しく上昇した (Fig.8 (b))。TEL-d3 の投与量はすべての群で等しい (0.005 mg/kg) ことから、TEL-d3 は動態的に TEL と区別されることなく TEL と同じ挙動を示すことが再確認された。したがって、Fig. 8 (b)の結果より、TEL の CL_{tot} は 2 mg/kg 以上の投与量範囲で低下するものと考えられる。TEL の体内動態が非線形となるメカニズムを詳細に解析するため、以下の式に従って吸収、消失に関する PK パラメータを算出した。

$$CL_{tot} = CL_{tot,plasma} / R_b \quad (2)$$

$$CL_h = CL_{tot} - CL_r \quad (3)$$

$$F_h = 1 - CL_h / Q_h \quad (4)$$

$$F = \frac{AUC_{po}/Dose_{po}}{AUC_{iv}/Dose_{iv}} \quad (5)$$

$$F_a \cdot F_g = F/F_h \quad (6)$$

ここで、 R_b , CL_h , CL_r , Q_h , F_h , $F_a \cdot F_g$ はそれぞれ血液中／血漿中濃度比、肝クリアランス、腎クリアランス、肝血流速度、肝初回通過回避率、消化管から門脈への移行率を示す。今回ラット血液中での TEL の R_b は 0.81、ラットの Q_h は 4.2 L/h/kg の値を用いた²⁰⁻²²。TEL の腎排泄はラット、イヌ、ヒトで全体の 0.1% ~ 4%程度と報告されており²³、 CL_r は CL_h に比べて無視できる ($CL_{tot} = CL_h$) とした。また、TEL-d3 は TEL と同じ体内動態を示すことから、TEL-d3 静注後の血中濃度推移より求めた CL_{tot} は TEL の CL_{tot} と等しいとして、式(2)-(6)より算出した各パラメータを Table 5 に示した。さらに、算出した CL_{tot} , $F_a \cdot F_g$ と Dose との関係性を Fig. 10 に示した。投与量が 2.0 mg/kg から 6.0 mg/kg に増加した場合、 CL_{tot} は 1.47 から 0.50 へと有意に低下し、TEL の消失過程に飽和が生じたことが明らかとなった。それに伴い、 F_h も 0.65 から 0.88 へと上昇した。一方、 $F_a \cdot F_g$ は投与量が 0.1 ~ 2 mg/kg の低投与量域では急激に上昇し、それ以上の投与量域では低下した。また、投与量が 2 mg/kg において $F_a \cdot F_g$ は 1.17 と 1 よりも大きな値となったが、これは計算上 F_h が F よりも低く算出された個体がいたためであり、有意差検定により $F_a \cdot F_g$ は 1 と有意な差がないことが示されている。すなわち、この投与量において $F_a=1$ かつ $F_g=1$ であり、経口投与された TEL は完全に吸収され、また消化管上皮細胞における代謝を受けず、すべてが門脈に移行したことが示唆された。

Table 5 PK parameters of orally administered TEL at each dose.

| Dose | 0.1 mg/kg | 2.0 mg/kg | 6.0 mg/kg | 20 mg/kg |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CL_{tot} (L/h/kg) | 1.66 ± 0.55 | 1.47 ± 0.48 | 0.50 ± 0.10 | 0.41 ± 0.18 |
| F | 0.25 ± 0.10 | 0.76 ± 0.33 | 0.88 ± 0.02 | 0.90 ± 0.15 |
| F_h | 0.60 ± 0.11 | 0.65 ± 0.09 | 0.88 ± 0.02 | 0.90 ± 0.03 |
| $F_a \cdot F_g$ | 0.42 ± 0.22 | 1.17 ± 0.58 | 0.58 ± 0.18 | 0.25 ± 0.17 |

F , F_h and $F_a \cdot F_g$ values were calculated by equations (2)-(6) in each rat using the data of orally administered TEL and IV injected TEL-d3.

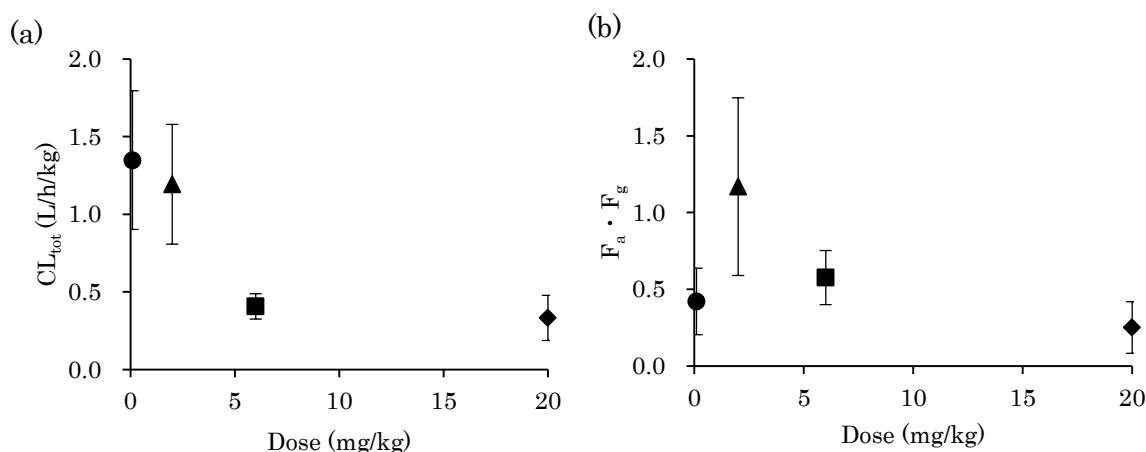


Fig. 10 Relationship between (a) Dose and CL_{tot} and (b) Dose and $F_a \cdot F_g$. Data are expressed as mean \pm SD (n=4).

1.2-3) 考察

TEL は高血圧の治療薬として広く臨床で用いられている経口剤であるが、投与後の血中濃度には個体間でのばらつきが大きく、また、ヒトにおいて血中濃度が投与量に比例しないことが報告されている^{18,24,25)}。本検討においても、経口投与後の TEL の血中濃度レベルは投与量に比例せず、またそのばらつきは高投与量群 (20 mg/kg) で大きくなった。

TEL の体内動態における複雑な非線形性には、物理化学的および生理学的な要因が関与していると考えられる。TEL は分子中に 1 つのカルボキシル基と 2 つのベンズイミダゾール基の計 3 つの解離基を有しているため、その溶解度は溶液 pH の影響を強く受ける。酸性もしくは塩基性条件下では良好な溶解性を示すものの、pH3~8 の中性領域の溶解度は 1 μ g/mL 以下と極めて低くなることが報告されている²⁶⁾。TEL を経口投与した場合、pH の低い胃内ではほぼ溶解するものの、pH が 6.0-7.5 程度である十二指腸、空腸に移行後、溶解度の低下に伴って再析出が生じる。そのため、TEL を高投与量経口投与すると管腔内での溶解が飽和し、吸収量が頭打ちすることで体内動態が非線形性を示すと考えられる^{27,28)}。一方、近年の研究により、胃内で一旦溶解した TEL は中性領域においても直ちに析出することなく、過飽和現象によって飽和溶解度よりも高い溶解濃度が維持されることが報告されている²⁹⁾。しかしながら、過飽和現象は一過性であり、最終的には析出が生じて濃度は飽和溶解度まで低下するため、TEL 高投与量群では、胃から空腸、回腸へと薬物が移動していくとともに、溶解・過飽和・析出と言う

現象が逐次的に起こり、その結果消化管内濃度に大きな変動が生じる。消化管からの薬物吸収速度は管腔内で溶解状態にある薬物の濃度と膜透過性の積として表されることから²⁵⁾、一過性の過飽和溶解は、高投与量における TEL の血中濃度の大きな個体間差の要因の一つと推察される。

Fig. 10(b) において、2 ~ 20 mg/kg の高投与量域で TEL の $F_a \cdot F_g$ が低下した理由として、消化管内での溶解飽和が考えられる。そこで、ラット小腸内液の組成および pH を模擬した溶液 (Fasted State Simulating Intestinal Fluid; FaSSIF) 中での TEL の飽和溶解度を調べたところ、約 150 $\mu\text{g/mL}$ であった。ラット小腸内には 0.5 ~ 1.0 mL の溶液が存在していることが報告されていることから³⁰⁾、投与量が 2 mg/kg の時 (1 mg/mL, 2 mL/kg)、投与後の消化管内での TEL 濃度はおよそ 250 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ になると想定される。よって、胃内の酸性条件下で一旦溶解した後、過飽和現象により消化管内での TEL の溶解濃度がある程度維持されたとしても、2 mg/kg 以上の投与量では消化管内濃度はラット FaSSIF 中の飽和溶解度以上となる。過飽和状態からの薬物の析出は、過飽和度 (過飽和時の溶解濃度 / 飽和溶解度) が高いほど速やかに起こることから²⁹⁾、投与量の増加に伴って小腸において TEL が一気に析出し、 $F_a \cdot F_g$ が低下したと考えられた。

一方、TEL の $F_a \cdot F_g$ は投与量が 0.1 ~ 2 mg/kg の間で急激な上昇を示した。薬物の $F_a \cdot F_g$ に影響を及ぼす主たる要因は、先に述べた溶解性の他、消化管粘膜透過性および消化管上皮細胞内での代謝 (初回通過効果) である。このうち消化管内での溶解飽和は $F_a \cdot F_g$ の低下を招くことから、低投与量での上昇は膜透過あるいは代謝過程の飽和に起因する。TEL は排出型トランスポーターの P-gp の基質であるため、膜透過性の上昇の原因の一つとして P-gp の飽和が考えられる³¹⁾。P-gp を高発現させた MDCK II 細胞 (イヌ腎尿細管由来の培養細胞) を用いた膜透過試験において、TEL の apical 側濃度が 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ においては、TEL の basal 側から apical 側 (排出方向) への膜透過性が apical 側から basal 側 (吸収方向) への膜透過性より有意に高かったものの、100 $\mu\text{g/mL}$ では両方向の膜透過性がほぼ等しくなったことが報告されている¹⁸⁾。これは、TEL 濃度が 100 $\mu\text{g/mL}$ の時 P-gp が飽和していることを意味している。先述したように、本研究でのラット経口投与試験において、投与を 2 mg/kg とした場合の消化管内濃度は約 250 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ と推定される。したがって、それ以下の投与量において P-gp が次第に飽和し、投与量 0.1 ~ 2 mg/kg の間で F_a が上昇した可能性が考えられる^{32,33)}。また、¹⁴C-TEL を低用量 (0.5 mg/kg) または高用量 (10 mg/kg) の TEL と共に経口投

与した時の小腸、肝臓、血中での放射活性を PET を用いて観察した結果、 ^{14}C -TEL 単独時 (0.001 mg/kg) と比べて、TEL 併用時に小腸での放射活性の低下、および肝臓中放射活性の上昇が認められている¹⁹⁾。これは、0.5 mg/kg の投与量において TEL の門脈への移行率 ($F_a \cdot F_g$) が上昇していることを意味しており、本研究の結果と一致するものである。一方、TEL は UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の基質であり、主に肝臓中で抱合体となり胆汁排泄されることが知られている³⁴⁾。ラット小腸での抱合代謝活性に関しては今後より詳細な検討が必要であるものの、消化管上皮細胞での代謝が TEL の吸収率に影響しているとの報告もあり、その飽和が $F_a \cdot F_g$ の上昇の要因となっている可能性も否定できない³⁵⁾。

吸収された TEL の CL_{tot} は、投与量が 2.0 ~ 6.0 mg/kg の範囲で投与量の増加にともなって有意に低下した。TEL は肝実質細胞の血管側膜に発現している取り込み型のトランスポーターである OATP によって肝臓に取り込まれ、肝細胞内でグルクロン酸抱合を受けた後、P-gp や BCRP, MRP2 (multidrug resistance - associated protein 2) などの排出型トランスポーターを介して胆汁排泄されることが知られている^{30, 34, 36)}。Takashima らは、 ^{14}C -TEL を微量静脈内投与した場合には選択的に肝臓に分布するのに対し、OATP の阻害剤であるリファンピシンあるいは高用量の TEL を併用した場合には肝臓への分布が著しく抑制されることを報告している¹⁹⁾。これは、TEL の肝クリアランスが OATP による肝取り込み速度によって律速されており、その後のグルクロン酸抱合代謝および胆汁中排泄速度が肝クリアランスに与える影響は小さいことを意味している。したがって、投与量 2.0 ~ 6.0 mg/kg の範囲で TEL の CL_{tot} が有意に低下した要因として、OATP による肝取り込み過程の飽和が寄与していることが示唆された。

以上、TEL の体内動態における非線形性に関し、同位体 *iv* 法を用いて測定した TEL および TEL-d3 の血中濃度推移の速度論的な解析を行った結果、複雑な非線形性の主たる要因として、消化管内での溶解飽和、小腸に発現している P-gp を介した排出方向への輸送の飽和、および OATP を介した肝取り込みの飽和、が関与することが示された。また、それぞれの過程が異なる投与量の範囲で飽和するため、TEL の体内動態が極めて複雑になったと考えられる。

本章では、同位体 *iv* 法を用いて TEL の体内動態に関する詳細な解析を行うことによって、体内動態試験における本手法の妥当性と有用性を示した。次章においては、同様の手法を用いた薬物間相互作用の解析を試みた。

第2章 薬物代謝酵素およびトランスポーターを介した薬物間相互作用の解析

複数の薬物の併用あるいは食品やサプリメントとの食べ合わせによって、対象とする薬物の体内動態に関わる代謝酵素やトランスポーターが阻害／誘導された場合、その薬物の血中濃度レベルが単独投与時に比べて変化し、予期せぬ副作用や薬効の低下を招くことがある³⁷⁻³⁹。このような動態学的相互作用のうち臨床的に最も頻度が高いのは、代謝酵素の阻害によって薬物の血中濃度が上昇したために生じる副作用の発現である⁴⁰。CYPは薬物、飲食物の酸化的代謝を行う最も重要な酵素の一つであり、なかでもCYP3A4はヒト肝臓での発現量が全代謝酵素の約30%、小腸での発現量はCYP全体の約70%と多く、薬物代謝酵素として最も重要な酵素である^{41, 42}。市販されている薬物の約半数はCYP3A4の基質であると報告されており⁴³、CYP3A4の基質となる薬物の併用は、臨床上高い確率で起こり得る。特に経口投与の場合、併用によって小腸と肝臓両部位での代謝が阻害されるため、相互作用を受けた薬物の血中濃度が著しく上昇してしまう可能性が高い。

一方、トランスポーターを介した薬物間相互作用についても、近年、臨床上多くの問題が報告されている⁴⁴⁻⁴⁶。小腸にはP-gpやBCRPといった排出型トランスポーターが発現しており、薬物の小腸から門脈への以降を制御している^{47, 48}。また、肝細胞の血管側にはOATPファミリーの一連のトランスポーターが発現しており、ヒト肝臓においては特にOATP1B1とOATP1B3が有機アニオン化合物の肝取込みに重要な役割を果たしていることが知られている⁴⁹。他にも肝細胞の胆管側や腎臓、脳など様々な臓器でトランスポーターが薬物移行を制御しており、これらの阻害／誘導によって薬物の血中濃度が著しく変化するケースが報告されている^{50, 51}。特に我が国では、多剤を併用する患者が多く、薬物間相互作用による重篤な有害事象の発生を阻止するためにも、医薬品開発の早期に詳細な解析を行い、起こりうる相互作用の程度やそのメカニズムについて明らかにしておく必要がある。

第1章では、新たに考案した同位体iv法を用いることによって、経口投与と静脈内投与実験を別々に行っていた従来と比較して簡便かつより詳細な動態解析が可能であることを明らかにした。本手法は、経口剤の薬物間相互作用の解析にも応用可能であると考えられることから、本章では、同位体iv法を用いたラットでの*in vivo*実験を行い、薬物代謝酵素およびトランスポーターを介した薬物間相互作用について速度論的な解析を試みた。

第1節 薬物代謝酵素を介した薬物間相互作用の解析

薬物代謝酵素を介した薬物間相互作用を解析するにあたり、モデル薬物として、第1章において同位体効果がなく、同位体 *iv* 法に利用可能であることが示された VER およびその重水素 6 置換体である VER-d6 を用いた。VER はヒトにおいて主に CYP3A4 による代謝を受け、その主代謝物は N-desmethyl VER であり、VER-d6 では VER の代謝部位から離れた部分が重水素標識されている (Fig. 2(b))。代謝阻害剤としては、CYP 酵素の非特異的な阻害剤である 1-アミノベンゾトリアゾール (ABT, Fig. 11(a)) を用いた。ABT は CYP に対しては強力な阻害作用を示すものの、UGT やスルホトランスフェラーゼ (SULT) などの抱合代謝酵素、および P-gp や OATP などの薬物トランスポーターにはほとんど影響しないことが知られている^{52, 53)}。また、実際に臨床的に用いられている薬物として、CYP3A4 および P-gp に対する阻害効果を有するイトラコナゾール (ITZ, Fig. 11(b)) を用いた。

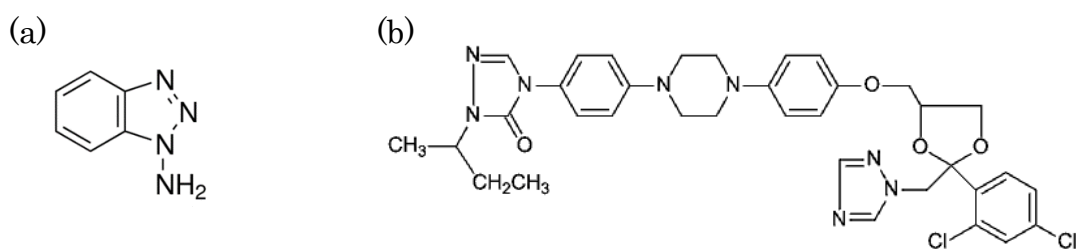


Fig. 11 Chemical structures of (a) ABT and (b) ITZ.

2.1-1) 従来法を用いた代謝阻害の影響の解析

同位体 *iv* 法による解析を行う前に、まず従来法によって ABT 併用による VER の体内動態の変化について解析を行った。コントロール群として①VER 単独の経口投与(1 mg/kg)、②VER 単独の静脈内投与 (0.1 mg/kg)、ABT 併用群として③VER 経口投与+ABT 経口投与、④VER 静脈内投与+ABT 経口投与、の計 4 群のラットを用いて試験を行い、それぞれ VER の血中濃度推移を観察した。なお併用群では、VER 投与 18 時間前に ABT (100 mg/kg)を経口投与した。Fig. 12 に、ラットに VER を (a) 経口投与および (b) 静脈内投与した時の血中濃度推移を示した。ABT 併用群ではコントロール群に比べて経口投与後の VER の血中濃度が有意に上昇した。また、VER 静脈内投与後の血中からの消失は明らかに遅延した。

Table 6 にそれぞれの群における VER の血中濃度推移から求めた PK パラメータを

示した。VER 経口投与後、最高血中濃度 (C_{max}) は ABT 併用により約 53 倍、 AUC_{po} は約 58 倍にも増加した。また、 CL_{tot} はコントロール群の約 1/3 に低下した。

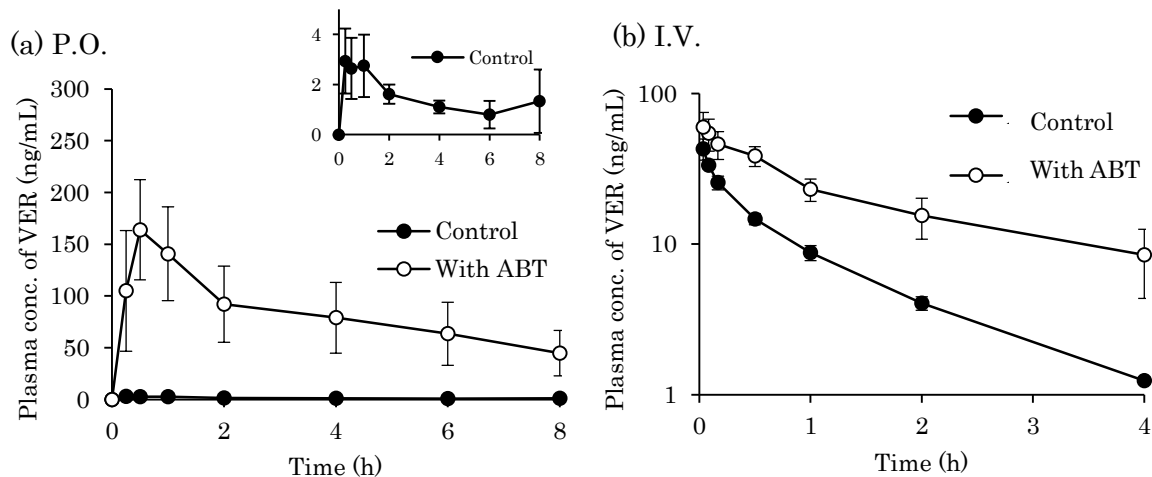


Fig. 12 Plasma concentration of VER after (a) oral and (b) intravenous administration to rats with or without ABT.

Plasma concentration of VER was examined after intravenous (0.1 mg/kg) or oral (1.0 mg/kg) administration to rats with (open symbol) or without (closed symbol) ABT (100 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SD (n=4).

Table 6 PK parameters of VER after intravenous and oral administration to rats with or without ABT by conventional method.

| Conventional method | P.O. | | I.V. | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| | C_{max} (ng/mL) | AUC_{po} (ng · h/mL) | CL_{tot} (L/h/kg) | Vd (L/kg) |
| Control | 3.08 ± 1.39 | 11.4 ± 3.3 | 3.22 ± 0.07 | 3.28 ± 0.20 |
| With ABT | 164 ± 48 | 661 ± 223 | 1.01 ± 0.37 | 2.28 ± 0.23 |

VER was orally administered at the dose of 1.0 mg/kg, and intravenously administered at the dose of 0.1 mg/kg.

2.1-2) 安定同位体 iv 法を用いた代謝阻害の影響の解析

次に ABT 併用による VER の体内動態の変化について、同位体 iv 法により解析し

た。本手法では、VER 単独経口投与群（コントロール群）および ABT 併用投与群の 2 群のみの試験で全ての解析が可能であり、用いるラット数は従来法の 1/2 に低減することが出来る。ABT 併用群では、従来法と同様に ABT を VER 経口投与 18 時間前にあらかじめ経口投与した。また両群とも、VER を経口投与した 90 分後に VER-d6 を静脈内に投与した。経口投与した VER の血中濃度 (Fig. 13(a)) は ABT 併用により著しく上昇し、コントロール群と比べ C_{max} は約 39 倍、 AUC_{po} は約 41 倍となった。また、Fig. 13(b) において、静脈内投与後の VER-d6 の体内からの消失は ABT 併用群で遅延し、 CL_{tot} はコントロール群の約 1/2 に低下した。

さらに、実際の臨床における薬物間相互作用を想定し、ITZ を併用薬として同様の検討を行った。ITZ 併用群では VER 投与 1 時間前に、あらかじめ ITZ (3 mg/kg) を経口投与した。Fig. 13(a) において、ITZ 併用によっても VER 経口投与後の血中濃度が有意に上昇し、 C_{max} は約 28 倍、 AUC_{po} は約 10 倍となった。一方、静脈内投与後の VER-d6 の体内からの消失に対する ITZ 併用の影響は ABT に比べて小さく (Fig. 13(b))、 CL_{tot} の値はコントロール群の約 81%であった (Table 7)。

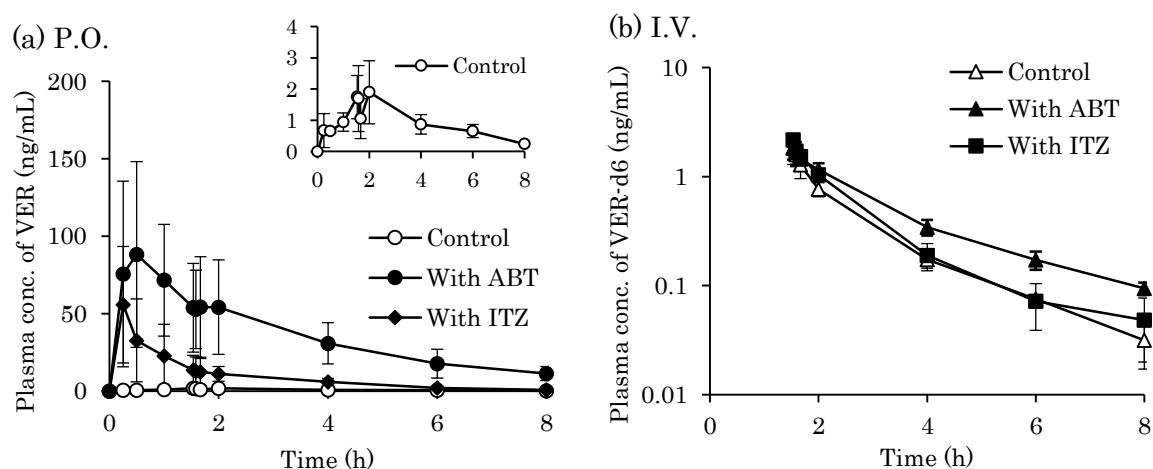


Fig. 13 Plasma concentration of (a) orally administered VER and (b) intravenously administered VER-d6 with or without inhibitors.

Plasma concentration of VER (1.0 mg/kg) was examined after its oral administration to rats with ABT (100 mg/kg, closed circle), ITZ (3 mg/kg, closed diamond) or without inhibitors (open circle). Plasma concentration of VER-d6 (0.005 mg/kg) was monitored after IV administration at 90 minutes after oral administration of VER with ABT (closed triangle), ITZ (closed square) or without inhibitors (open triangle). Data are expressed as mean \pm SD (n=3 or 4).

Table 7 PK parameters of orally administered VER and intravenously administered VER-d6 to rats with or without inhibitors by isotope-IV method.

| Isotope-IV method | P.O. (VER) | | I.V. (VER-d6) | |
|-------------------|----------------------|---------------------------|------------------------|--------------|
| | C_{max} (ng/mL) | AUC_{po} (ng · h/mL) | CL_{tot} (L/h/kg) | Vd (L/kg) |
| Control | 2.26±0.78 | 7.19±2.02 | 3.02±0.31 | 3.84±1.02 |
| With ABT | 88.3±60.0 | 292±154 | 1.82±0.24 | 3.49±0.50 |
| With ITZ | 63.3±49.9 | 75.0±47.9 | 2.46±0.04 | 2.80±0.61 |

VER was orally administered at the dose of 1.0 mg/kg, and VER-d6 was intravenously administered at the dose of 0.005 mg/kg at 90 minutes after oral administration of VER.

2.1-3) 小腸および肝臓における代謝酵素阻害の影響の解析

2.1-1)、2.1-2)において、VER 経口投与後および静脈内投与後の血中濃度推移を、従来法、同位体 *iv* 法により観察した。これらのデータから、式(2)~(6)に基づいて F 、 F_h 、 $F_a \cdot F_g$ を算出し、Table 8 にまとめた。また、それぞれコントロール群の値との比率を Inhibition ratio として算出した。なお、VER の R_b 値として文献⁵⁴⁾より 0.85 を用いた。

従来法による解析では、ABT 併用により F 、 F_h 、および $F_a \cdot F_g$ がそれぞれ 16.5 倍、3.25 倍、5.07 倍と有意に上昇した。一方同位体 *iv* 法では、ABT 併用による各パラメータの Inhibition ratio にやや違いは見られたものの、従来法とほぼ同程度の相互作用が確認できた。ITZ の阻害効果は ABT に比べて小さく、同位体 *iv* 法において F および F_h は 8.4 倍、1.47 倍と有意に上昇した。 $F_a \cdot F_g$ 値にも 4.33 倍の上昇が見られたものの、ばらつきが大きく有意な差は認められなかった。

Table 8 Effect of ABT and ITZ on F, F_h, and F_a · F_g of VER.

| | F | Inhibition ratio | F _h | Inhibition ratio | F _a · F _g | Inhibition ratio |
|----------------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|---------------------------------|------------------|
| Conventional method | | | | | | |
| Control | 0.0310 ± 0.0090 | --- | 0.234 ± 0.016 | --- | 0.133 ± 0.039 | --- |
| With ABT | 0.512 ± 0.172 | 16.5 | 0.760 ± 0.088 | 3.25 | 0.674 ± 0.227 | 5.07 |
| Isotope-IV method | | | | | | |
| Control | 0.0188 ± 0.0065 | --- | 0.281 ± 0.073 | --- | 0.0729 ± 0.0360 | --- |
| With ABT | 0.449 ± 0.224 | 22.9 | 0.566 ± 0.057 | 2.01 | 0.805 ± 0.409 | 11.0 |
| With ITZ | 0.158 ± 0.102 | 8.40 | 0.414 ± 0.010 | 1.47 | 0.316 ± 0.207 | 4.33 |

Inhibition ratio between each value with ABT or ITZ and the respective control value.

F, F_h and F_a · F_g values were calculated by equations (2)-(6).

2.1-4) 考察

本節では、代謝酵素阻害による VER の体内動態の変動を従来法と同位体 *iv* 法を用いて解析し、両手法で得られた PK パラメータを比較することによって、同位体 *iv* 法の薬物間相互作用試験における妥当性、有用性を検証した。従来法、同位体 *iv* 法ともに、経口投与後の VER 血中濃度および静脈内投与後の VER/VER-d6 の血中濃度は、CYP 酵素の非特異的阻害剤である ABT の併用によって有意に上昇した。この時、VER および VER-d6 の血中濃度推移から算出した CL_{tot} および F , F_h , $F_a \cdot F_g$ は従来法で得られた値と絶対的に若干の違いが認められた。しかしながら、これは両手法で得られたデータの本質的な違いによるものではなく、従来法では経口投与と静脈内投与が異なる個体で実施されたためと考えられることから、VER-d6 を用いた同一個体での動態解析の妥当性が示唆された。

VER の吸収に関するパラメータのうち、 $F_a \cdot F_g$ は ABT 併用によって 5~10 倍程度上昇した。ABT は VER の溶解性や P-gp による排出方向への輸送には影響を与えないことから、 $F_a \cdot F_g$ が大きく上昇した理由として、消化管上皮細胞内での CYP3A4 による代謝が阻害され、 F_g が上昇した可能性が挙げられる。同様に、VER の F_h の上昇も、肝臓内での CYP3A4 代謝の阻害による肝初回通過効果の低下によるものと考えられる。また、従来法、同位体 *iv* 法いずれにおいても $F_a \cdot F_g$ の上昇率は F_h より大きくなったことから、VER の吸収に対する ABT の代謝阻害効果は肝臓 (F_h) よりも小腸 (F_g) で強く現れることが明らかとなった。

ITZ の市販製剤であるイトリゾールカプセル®の添付文書には、VER が併用注意薬物として記載されていることから⁵⁵⁾、VER と ITZ の相互作用について同位体 *iv* 法を用いた解析を行った。ITZ 併用群ではコントロール群と比べて VER の AUC_{po} は 10 倍上昇し、ABT に比べると程度は小さかったものの、ITZ は経口投与された VER の血中曝露を顕著に高めることが示された。この時、VER の CL_{tot} の低下は 20%程度であったことから、吸収過程での相互作用が血中曝露上昇の主たる要因と考えられた。

ITZ は P-gp に対して強い阻害効果を有し、フェキソフェナジンのような P-gp 基質薬物の排出輸送を阻害することが知られている⁵⁶⁾。また Estudane らは、P-gp 阻害剤の GG91 が、ラット小腸上皮粘膜を介した VER の膜透過性を有意に上昇させることを見出した⁵⁷⁾。しかしながら、VER 自体の小腸粘膜に対する透過性は十分に高く、P-gp を阻害しない場合でも経口投与後ほぼ完全に吸収されることから、ITZ の併用によってその吸収速度は上昇するものの、 F_a はほとんど変化しないと考えられる。一方、ITZ は

CYP3A4 の典型的な阻害剤であり、ミダゾラムなど CYP3A4 の基質薬物の経口投与後の全身曝露を有意に増加させることが知られている⁵⁸⁾。よって、Table 8 において ITZ 併用により VER の $F_a \cdot F_g$ が 4.33 倍に上昇した主たる理由として、小腸上皮細胞に発現している CYP3A4 を阻害することによって、小腸での初回通過代謝の程度 ($E_g = 1 - F_g$) が低下したと推察された。

以上、本節では従来法と同位体 *iv* 法を用いて VER の体内動態に及ぼす ABT および ITZ 併用の影響を解析した結果、同位体 *iv* 法によって薬物間相互作用を簡便に解析可能であることを明らかにした。

第 2 節 トランスポーターを介した薬物間相互作用の解析

近年、薬物の体内動態に関与する様々なトランスポーターが同定されるにつれて、トランスポーターを介した薬物間相互作用の重要性が認識されてきた。FDA (U.S. Food and Drug Administration ; 米国食品医薬品局)は、2012 年に “Guidance for Industry on Drug Interactions Studies”⁵⁹⁾を策定し、臨床上問題となる相互作用を生じる可能性のあるトランスポーターとして P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2 (Organic Cation Transporter 2) をリストアップした。本ガイダンスでは、薬物がこれらのトランスポーターの基質もしくは阻害剤となり得るかを評価し、もし基質あるいは阻害剤であった場合には、薬物間相互作用に関する追加試験が要求される。

そこで第 2 節では、トランスポーターを介した薬物間相互作用に関して同位体 *iv* 法を用いた解析を試みた。モデル薬物として、肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 の基質として知られているアトルバスタチン (ATV, Fig.14 (a)) およびその重水素標識体としてアトルバスタチン重水素 5 置換体 (ATV-d5, Fig. 14(b)) を用いた。ATV は、高脂血症の治療に広く用いられているスタチン系薬剤であり、肝臓で CYP3A4 および UGT により代謝された後、P-gp, BCRP 等によって胆汁排泄される。OATP1B1 の阻害剤にはリファンピシン (RIF, Fig. 15) を用いた。RIF は繰り返し投与により CYP 誘導作用を持つ反面、単回投与では OATP1B1 に対する阻害作用を有することが報告されている^{60, 61)}。

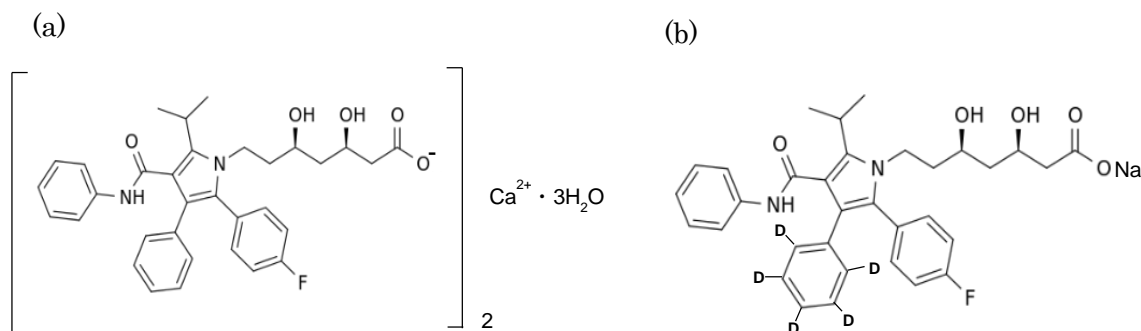


Fig.14 Chemical structures of (a) ATV and (b) ATV-d5.

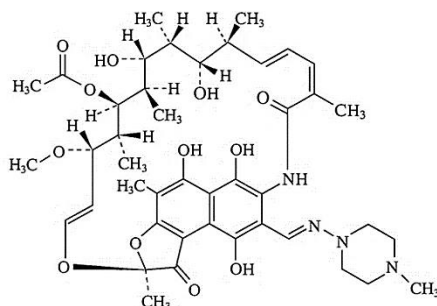


Fig. 15 Chemical structure of RIF.

2.2-1) 従来法を用いた取り込み阻害の影響の解析

第1節と同様、同位体 *iv* 法による解析を行う前に、従来法を用いて RIF 単回併用時の ATV の体内動態の変動に関する解析を行った。従来法では、コントロール群として①ATV 単独の経口投与 (10 mg/kg)、②ATV 単独の静脈内投与 (0.1 mg/kg)、RIF 併用群として③ATV 経口投与+RIF 経口投与、④ATV 静脈内投与+RIF 経口投与の、計4群のラットを用いて試験を行い、それぞれ ATV の血中濃度推移を観察した。なお併用群では、ATV 投与1時間前にあらかじめ RIF を経口投与 (30 mg/kg) しておいた。Fig. 16 に、ATV ラット経口投与後の血中濃度推移 (a) と静脈内投与後の血中濃度推移 (b) を、Table 9 に得られた PK パラメータを示した。RIF 併用群ではコントロール群に比べて、経口投与後の ATV 血中濃度は明らかに高く、AUC_{po} は約 5.5 倍、C_{max} は約 6.2 倍上昇した。ATV の BA (F) はコントロール群では約 0.98% とかなり低く、RIF 併用により約 3.6 倍上昇した。RIF 併用時には静脈内投与した ATV の体内からの消失も遅延し、CL_{tot} はコントロール群の約 68% に低下していたことから、ATV 経口投与後の血中

曝露の上昇は、BA の上昇と CL_{tot} の低下の両方の要因によって引き起こされたと考えられた。また、RIF 併用群では C_{max} が 50 ~ 230 ng/mL と経口投与後の血中濃度のばらつきが顕著に観察された。

Table 9 PK parameters of ATV after intravenous and oral administration to rats with or without RIF by conventional method.

| Conventional method | P.O. | | | I.V. | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | C_{max} (ng/mL) | AUC_{po} (ng · h/mL) | F (%) | CL_{tot} (L/h/kg) | Vd (L/kg) |
| Control | 25.2 ± 5.8 | 89.7 ± 25.5 | 0.980 ± 0.241 | 1.09 ± 0.05 | 0.586 ± 0.072 |
| With RIF | 156 ± 77 | 489 ± 247 | 3.52 ± 1.54 | 0.746 ± 0.165 | 0.653 ± 0.215 |

Bioavailability (F) was calculated by equation (5).

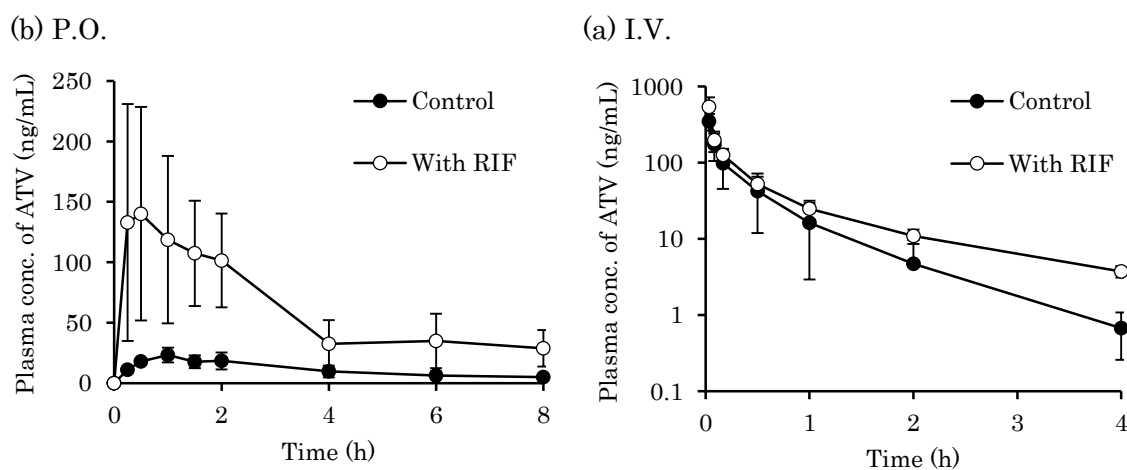


Fig. 16 Plasma concentration of ATV after (a) oral and (b) intravenous administration to rats with or without RIF.

ATV was orally (10mg/kg) or intravenously administered (0.1 mg/kg) to rats with (open circle) or without (closed circle) RIF (30 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SD (n=3 or 4).

2.2-2) 安定同位体 iv 法を用いた取り込み阻害の影響の解析

次に同位体 iv 法による ATV と RIF の相互作用の解析を試みた。同位体 iv 法を用いるにあたり、重水素標識によって ATV の体内動態が変化しない（同位体効果が無い）ことを検証しておく必要がある。そこで、ラットに ATV (0.1 mg/kg) および ATV-d5 (0.005 mg/kg) を静脈内に同時に投与し、それぞれの血中濃度から得られた PK パラメータを比較した。

ラットに ATV, ATV-d5 を静脈内投与した時の血中濃度推移を Fig. 17 に示す。投与量が 20 倍異なるため血中濃度は異なるが、静脈内投与後の血漿中濃度推移は両化合物とも同様であり、ATV と ATV-d5 の PK パラメータは、それぞれ CL_{tot} (L/h/kg) は 1.12 ± 0.69 、 1.16 ± 0.68 、 Vd (L/kg) は 0.24 ± 0.07 、 0.24 ± 0.09 と、ATV と ATV-d5 で有意な差は認められなかった。よって、ATV-d5 には重水素標識による同位体効果は無く、その PK パラメータを ATV の動態に関するパラメータとして扱えることが示された。

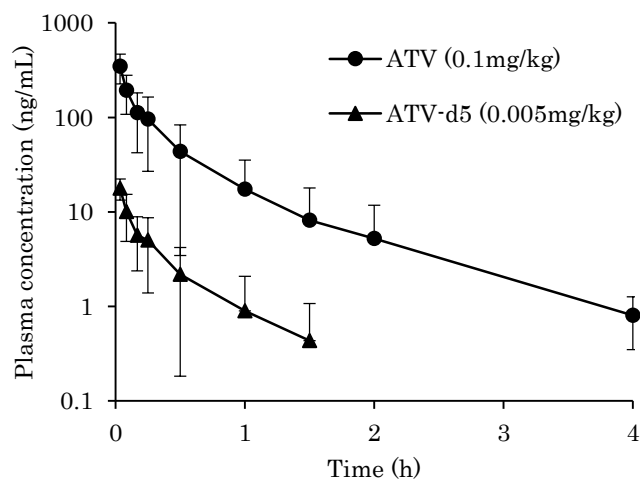


Fig. 17 Plasma concentrations of ATV and ATV-d5 after their intravenous administration to same rats.

Plasma concentration of ATV (0.1 mg/kg, closed circle) and ATV-d5 (0.005 mg/kg, closed triangle) were examined after simultaneous injection to rats. Data are expressed as mean \pm SD (n=3).

ATV-d5 に同位体効果がないことが確認されたため、同位体 iv 法を用いて ATV と

RIF の相互作用の解析を試みた。ATV をラットに経口投与し、その 90 分後に ATV-d5 を静脈内投与した。RIF 併用群では、従来法と同様、ATV 経口投与 1 時間前にあらかじめ RIF を経口投与しておいた。Fig. 18 に、コントロール群における ATV 経口投与後のラット個体ごとの血中濃度推移 (a) および ATV-d5 静脈内投与後の血中濃度推移 (b) と、RIF 併用群における ATV 経口投与後の血中濃度推移 (c)、ATV-d5 静脈内投与後の血中濃度推移 (d) を示した。コントロール群では、ATV 経口投与後およそ 0.25 h で T_{max} をむかえ、 C_{max} は 10~20 ng/mL であった。一方、RIF 併用群では経口投与後の ATV 血中濃度は著しく上昇し、かつ 9 匹の C_{max} には 27.4~727 ng/mL と非常に大きなばらつきが認められた。また、Fig. 17 (b), (d) から明らかな様に、RIF 併用により静脈内投与後の ATV-d5 の消失も明らかに遅延した。

ATV および ATV-d5 の血中濃度推移から算出した各 PK パラメータを Table 10 にまとめた。RIF 併用により、経口投与後の C_{max} 、 AUC_{po} はそれぞれ 18 倍、26 倍となり、吸収率 (F) は 8.1 倍上昇した。また、肝取り込み阻害により全身からの消失も遅延し、 CL_{tot} はコントロール群の 37% まで低下した。

Table 10 PK Parameters of orally administered ATV and intravenously administered ATV-d5 with or without a pretreatment with RIF by isotope-IV method. Bioavailability (F) was calculated by equation (5).

| Isotope IV-method | P.O. (ATV) | | | I.V. (ATV-d5) | |
|----------------------|----------------------|---------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| | C_{max} (ng/mL) | AUC_{po} (ng · h/mL) | F (%) | CL_{tot} (L/h/kg) | Vd (L/kg) |
| Control | 13.6 ± 4.2 | 29.3 ± 6.6 | 0.980 ± 0.241 | 1.93 ± 0.42 | 0.684 ± 0.140 |
| With RIF | 241 ± 254 | 765 ± 742 | 5.30 ± 4.39 | 0.719 ± 0.269 | 0.587 ± 0.161 |

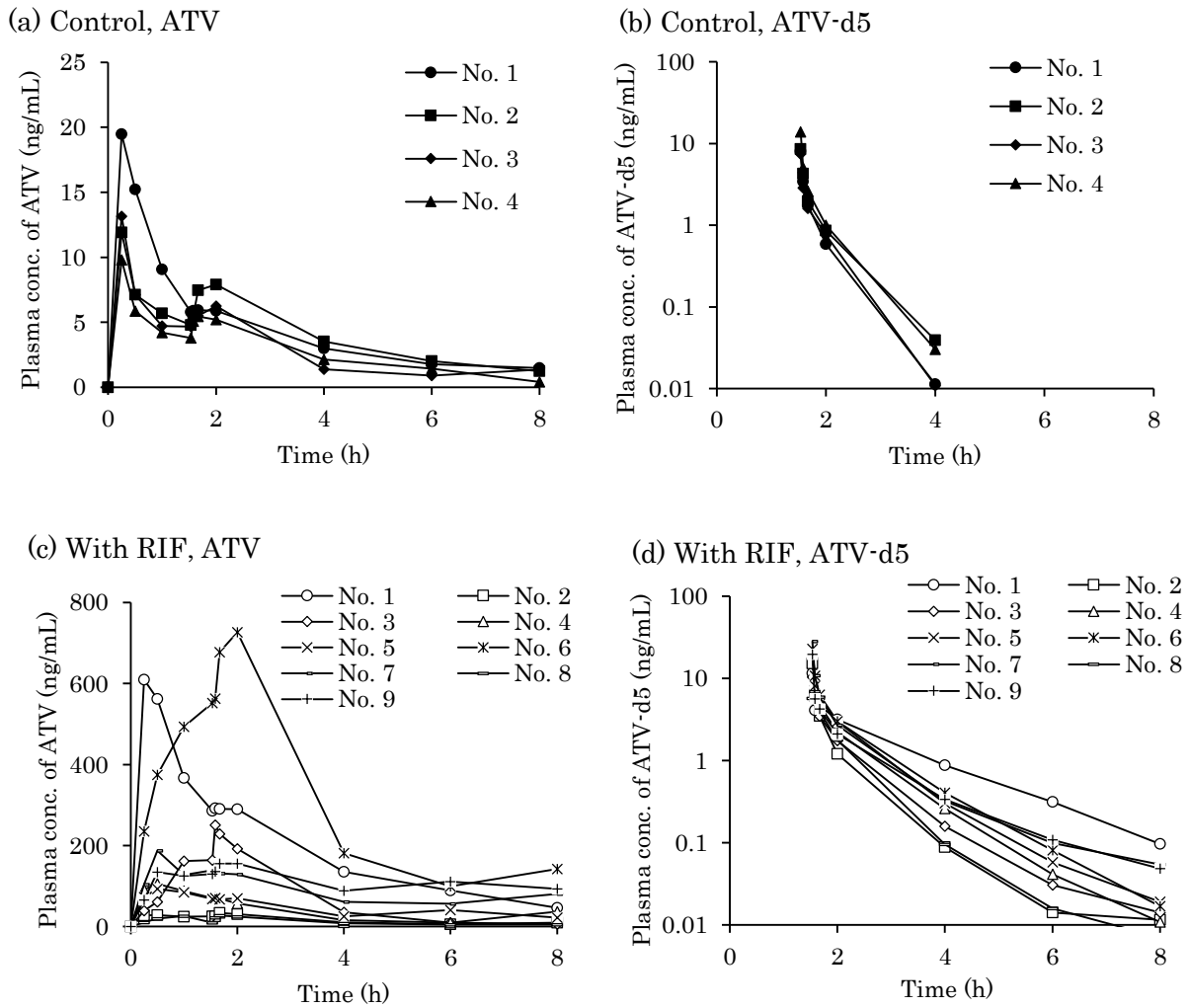


Fig. 18 Effect of RIF pretreatment on plasma concentration-time profile of orally administered ATV (a, c) and intravenously administered ATV-d5 (b, d).

Individual plasma concentration-time profiles of ATV (10 mg/kg) and ATV-d5 (0.005 mg/kg) are shown in (a) and (b), and (c) and (d) with RIF (30 mg/kg). Same symbols defined in (a) and (c) are used for each rat in (b) and (d), respectively.

2.2-3) 阻害剤の血中濃度の影響の解析

Fig. 18 からわかるように、経口投与後の ATV 血中濃度推移にはラット個体ごとにばらつきが認められ、それは特に RIF 併用群で顕著であった。RIF 併用群での大きな個体間差の要因として、経口的に前投与された阻害剤の血中濃度のばらつきが関与している可能性を検証するため、上記の試験において RIF 併用群における RIF の血中濃度を同時に測定した。各個体の RIF 血中濃度推移を Fig. 19 に示す。

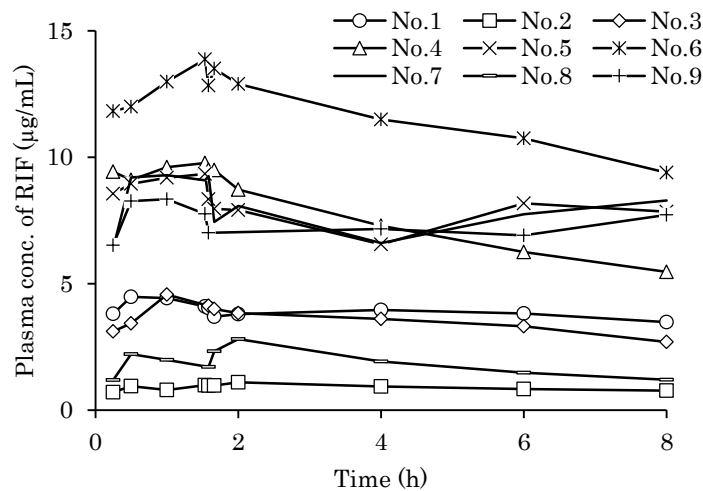


Fig. 19 Plasma concentration-time profiles of RIF. Same symbols defined in Fig.18 are used for each rat.

RIFは経口投与後、明確な C_{max} が検出されない個体も認められる様に、実験実施時間中はおよそ一定の血中濃度が維持されていた。しかしながら、同量投与したにもかかわらず、9匹のラットでRIF血中濃度には極めて大きなばらつきが見られ、 C_{max} は1.09 ~ 13.9 $\mu\text{g/mL}$ と10倍以上の違いを示した。そこで、RIF血中濃度のばらつきが薬物間相互作用に及ぼす影響を評価するため、個体ごとに0-8 hでのRIF平均血中濃度を算出し、ATV経口投与後の AUC_{po} および ATV-d5 静脈内投与後の AUC_{iv} について、RIF併用時（各個体ごとの値）とコントロール時（平均値）の比 ($AUC_{po, \text{with RIF}} / AUC_{po, \text{control}}$ および $AUC_{iv, \text{with RIF}} / AUC_{iv, \text{control}}$) との相関性を調べた (Fig. 20)。 AUC_{po} 、 AUC_{iv} 共に、RIFの平均血中濃度が高いほどAUCのコントロールに対する比率が大きくなる傾向が認められ、RIFの血中濃度のばらつきが各個体での薬物間相互作用の程度の違いの一因であることが示唆された。この時、ピアソンの相関検定により算出した相関係数 (r 値) は AUC_{iv} の方が AUC_{po} より大きく、0.75 と強い相関が認められ、 AUC_{iv} のみ有意な相関が認められた。 AUC_{po} については、コントロール群においても個体間でのばらつきが大きかったことから、RIF併用による変化率に有意な相関が認められなかったと考えられた。

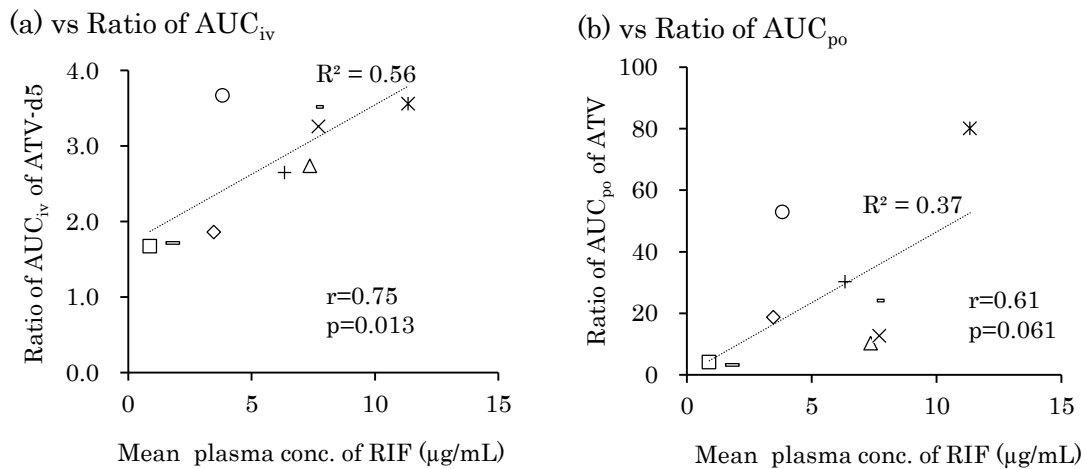


Fig. 20 Relationship between mean plasma concentration of RIF and (a) the ratio of AUC_{iv} of ATV-d5 ($AUC_{iv,with\ RIF}/AUC_{iv,control}$) and (b) AUC_{po} of ATV ($AUC_{po,with\ RIF}/AUC_{po,control}$).

Same symbols defined in Fig.18 are used for each rat.

さらに、第1章に示した式(2)~(6)に従い、ATVの経口投与後の吸収に関する各パラメータ F , F_h , および $F_a \cdot F_g$ を算出した。ATVのラット血中での R_b 値としては1.2を用いた⁶²⁾。Fig. 21に、個体ごとのRIF平均血中濃度と、ATVの F , F_h および $F_a \cdot F_g$ との関係を示した。図中、コントロール群におけるRIF平均血中濃度は0 ng/mL とし、コントロール群4匹のパラメータ値はすべてy軸上にプロットした。相関検定を行ったところ、 F , $F_a \cdot F_g$, F_h いずれにおいても有意な相関が認められ、算出した相関係数 (r) は F_h が F , $F_a \cdot F_g$ よりもやや高く、RIF血中濃度とより相関があることが示された。ただし、グラフから F および $F_a \cdot F_g$ に関しては、RIFの血中濃度が高いほど大きくなる傾向が見られたのに対し、RIF併用群の F_h はおおよそ0.7~0.9と一定の範囲に収まった。また、RIF併用群の F および $F_a \cdot F_g$ に認められた個体間でのばらつきはほぼ同じパターンであったことから、 F のばらつきの原因は消化管での吸収過程のばらつきに依存することが示された。

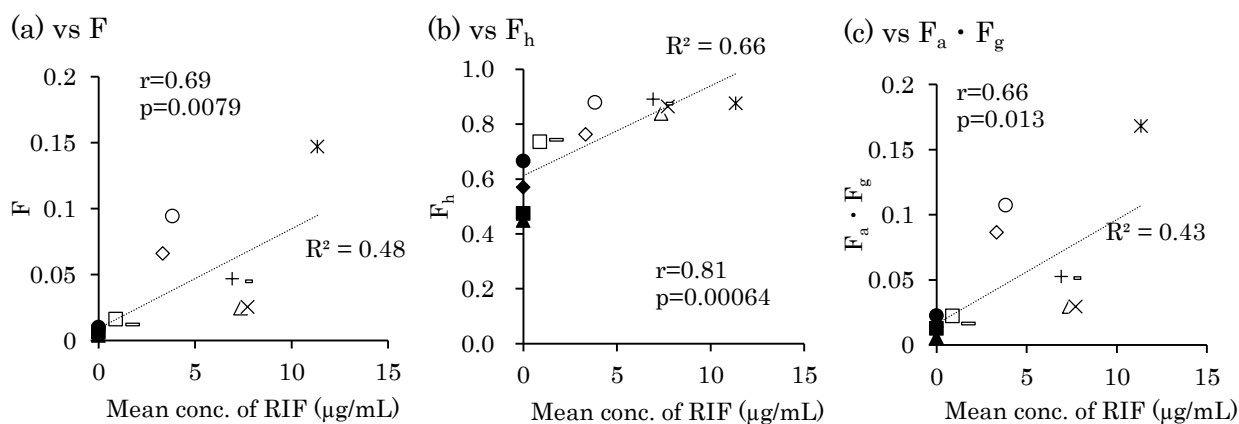


Fig. 21 Relationship between mean plasma concentration of RIF and (a) F, (b) F_h , and (c) $F_a \cdot F_g$ of ATV.

Each data in control group were shown at the plasma concentration of RIF being zero. Same symbols defined in Fig.18 are used for each rat.

2.2-4) 考察

第2節では、ATVとRIFとのトランスポーターを介した薬物間相互作用について、ATVの血中濃度の個体間でのばらつきを含めて詳細な解析を行った。また、阻害剤として投与されたRIFの血中濃度の影響についても考察を加えた。

Table 10に示したように、ATV経口投与後の血中曝露 (AUC_{po}) は、RIFの単回併用投与によって25倍程度上昇し、RIFによって強い相互作用を受けることが確認された。またその時、経口投与後のBAの上昇による増加率が5.4倍、血中からの消失の遅れ (CL_{tot} の低下) による増加率が3倍程度であり、吸収率の上昇と消失速度の低下の二つの要因が寄与していることが明らかとなった。

ヒトにおけるATVの体内からの主たる消失過程として、ATVはOATP1B1によって血液中から肝臓に取り込まれた後、CYP3A4およびUGTにより代謝され、最終的にP-gp, BCRP等の排出型トランスポーターを介して胆汁中に排泄されることが知られている。Maedaらのグループは、ATVの肝臓での消失過程における律速過程を明らかにすることを目的として、OATP1B1の阻害剤としてRIF、CYP3A4の阻害剤としてITZを用い、それぞれをATVと併用投与してマイクロドーズ臨床試験を実施したところ、

ATV の AUC_{po} は ITZ 併用時にはほとんど変化しなかったのに対し、RIF 併用によって 12 倍にも上昇することを見出した。この結果より、ATV は肝臓において CYP3A4 で代謝されるものの、肝からの消失の律速過程は OATP1B1 による取り込み過程であることが示唆された⁶¹⁾。ラットにおいてもヒトと同様に OATP トランスポーターを介した肝取り込み過程が ATV の肝消失の律速過程であると考えれば、本研究において RIF の併用によって ATV の CL_{tot} が低下した理由として、OATP トランスポーターの阻害に起因した薬物間相互作用と判断される。

酵素やトランスポーターの可逆的な阻害様式には、阻害剤が基質と同じ活性部位を競合する競合阻害、阻害剤が基質結合部位とは別の部位に結合して活性を低下させる非競合阻害、阻害剤が基質と酵素（あるいはトランスポーター）の複合体と結合して活性を低下させる不競合阻害がある。RIF の OATP1B1 に対する阻害は競合阻害であり⁶³⁾、ATV の結合親和性を低下させる。ここで、肝臓での代謝（あるいはトランスポーターによる取り込み）クリアランスが well-stirred モデルに従うとすると、肝クリアランス CL_h は、以下の式によって表される。

$$CL_h = \frac{Q_h \cdot f_b \cdot CL_{h,int}}{Q_h + f_b \cdot CL_{h,int}} \quad (7)$$

ここで f_b は薬物の血中タンパク非結合率、 $CL_{h,int}$ は肝固有クリアランスである。さらに $CL_{h,int}$ が Michaelis-Menten 式によって表されるとすると、

$$CL_{h,int} = \frac{V_{max}}{K_m + C} \quad (8)$$

となる。競合阻害によって $CL_{h,int}$ が低下する場合、最大速度 (V_{max}) は変化せず、式(8)に示すような形で Michaelis 定数である K_m 値が大きくなることによって親和性が低下する。

$$CL_{h,int}^{inhibited} = \frac{V_{max}}{K_m \left(1 + \frac{[Iu]}{K_i}\right) + C} \quad (9)$$

ここで $[Iu]$ は阻害剤の酵素近傍での遊離型濃度、 K_i は阻害定数であり、本検討では $[Iu]$ は RIF の血中遊離型濃度、 K_i はその阻害定数である。式(9)において、通常の臨床用量の範囲では多くの薬物で血中濃度 C が K_m 値より十分に小さくなるため、右辺分母の C を無視することによって、阻害の程度 (R) は下式のようになる。

$$R = \frac{CL_{h,int,control}}{CL_{h,int,inhibited}} = K_m \cdot \frac{1 + \frac{[Iu]}{K_i}}{K_m} = 1 + \frac{[Iu]}{K_i} \quad (10)$$

ATV の肝クリアランスが固有クリアランス律速であるとする、静脈内投与における相互作用の程度を表す R_{iv} 値は以下の式で表されることから、Fig. 20(a) に示された様に、ATV-d5 の AUC_{iv} のコントロールに対する比率が阻害剤である RIF の血中濃度に比例することになる⁶⁴⁾。

$$R_{iv} = \frac{AUC_{iv,with RIF}}{AUC_{iv,control}} = \frac{CL_{h,int,control}}{CL_{h,int,with RIF}} = 1 + \frac{[Iu]}{K_i} \quad (11)$$

また、肝クリアランスが well-stirred モデルに従うとすると、経口投与後の血中曝露 (AUC_{po}) は下式によって算出される。

$$\begin{aligned} AUC_{po} &= F_a \cdot F_g \cdot F_h \cdot \frac{Dose}{CL_h} = F_a \cdot F_g \cdot \frac{Q_h}{Q_h + f_b \cdot CL_{h,int}} \cdot Dose \cdot \frac{Q_h + f_b \cdot CL_{h,int}}{Q_h \cdot f_b \cdot CL_{h,int}} \\ &= F_a \cdot F_g \cdot \frac{Dose}{f_b \cdot CL_{h,int}} \end{aligned} \quad (12)$$

したがって、経口投与後の相互作用の程度を表す R_{po} 値は下式によって表わされる。

$$\begin{aligned} R_{po} &= \frac{AUC_{po,with RIF}}{AUC_{po,control}} = \frac{F_a \cdot F_g \cdot D_{with RIF}}{f_b \cdot CL_{h,int,with RIF}} \bigg/ \frac{F_a \cdot F_g \cdot D_{control}}{f_b \cdot CL_{h,int,control}} \\ &= \frac{F_a \cdot F_{g,with RIF}}{F_a \cdot F_{g,control}} \cdot \left(1 + \frac{[Iu]}{K_i} \right) \end{aligned} \quad (13)$$

式(13)より、経口投与後の AUC_{po} のコントロール比も、Fig. 20(b) に示されたように阻害剤の血中濃度 $[Iu]$ に比例することが理解できる。

Fig. 21(c) において、ATV の吸収過程に関するパラメータである $F_a \cdot F_g$ 値も RIF の血中濃度に依存して上昇することが明らかとなった。OATP1B1 は小腸上皮細胞には発現していないため、RIF 併用時に $F_a \cdot F_g$ が上昇した要因の一つとして小腸での初回通過代謝の阻害が考えられる。しかし、RIF は単回投与では CYP 酵素を阻害しないことから F_g が上昇した可能性は低い。一方、ATV の F_a に影響を与える要因として、ATV は小腸上皮細胞に発現している排出型トランスポーターである P-gp、BCRP および MRP2 の基質であることが報告されている^{65,66)}。Tsamandouras らは、BCRP の機能

を抑制する ABCG2 タンパク質をコードする遺伝子に変異があり BCRP の機能が低下している患者では、ATV の吸収率が有意に高いことを報告しており⁶⁷⁾、 F_a が上昇した要因の一つとして、RIF によって小腸の BCRP が阻害されたものと推察される。また、RIF は MRP2 を介した ATV の膜透過を阻害することも確認されており⁶⁸⁾、MRP2 阻害が F_a の上昇に関与している可能性も考えられる。今後、 F_a と F_g を分離して評価するため、各トランスポーターの阻害剤を用いた *in vivo* 実験や *in vitro* での代謝実験などさらに詳細な検討が必要と思われる。

Fig. 19 において、経口投与された RIF の血中濃度に個体間で大きなばらつきが認められ、その要因として RIF の吸収過程での個体間差が示唆された。本検討ではトランスポーターに対する阻害効果をより顕著に観察するため、臨床投与量 (450 mg/人) の約 3 倍の投与量 (30 mg/kg) の RIF をラットに経口投与している。RIF は一つの分子に、酸性解離基のフェノール性水酸基と、塩基性解離基の 3 級アミンとヒドラゾンを含む両性化合物である。そのため、酸性および塩基性領域では水中でイオン形として存在し良好な溶解度を示すことから、ラットに経口投与する際には RIF の懸濁液に適量の HCl を加えて完全に溶解させた。経口投与後、胃内では RIF は溶解した状態で存在するが、十二指腸、空腸への移行にともなって pH が上昇し、RIF は消化管内で析出を生じると予想される。第 1 章では、経口投与後、TEL が消化管内で過飽和溶解および過飽和からの析出を生じる可能性を論述したが、それと同じ現象が RIF でも起こると予想される。個体ごとの胃排出速度や消化管内での pH や液量の違いによって、RIF の溶解濃度に大きな個体差が生じ、それが吸収速度、吸収率に反映されたものと推察される。ヒトにおいても、南アフリカの患者を対象にした臨床試験において、rifampin の吸収率が患者によって大きく変動し、薬物治療の成功率を低下させる要因となっていることが報告されている⁶⁹⁾。Fig. 20 および 21 の結果から明らかな様に、RIF の様に酵素やトランスポーターに対して強い阻害／誘導作用を有する薬物では、その血中濃度のばらつきが、薬物間相互作用の個体間差の大きな要因となる。その様なケースでは、相互作用を受ける薬物のみでなく、相互作用を引き起こす薬物についても、その体内動態に関する十分な注意が必要であると考えられる。

以上、同位体 *iv* 法を用いることによって、薬物間相互作用の対象となる薬物の吸収および体内からの消失に関する各 PK パラメータを算出し、相互作用の要因解析およびその個体間差について詳細な検討を行った。同位体 *iv* 法では、1 回の実験で薬物の体内動態および阻害剤の血中濃度推移を個体ごとに解析可能であり、前臨床段階での薬物間

相互作用試験において極めて有用な手法と考えられる。

第3章 薬物間相互作用における種差の検討およびヒトへの外挿

第2章において、①代謝酵素阻害による VER 経口投与後の血中曝露の上昇、および②トランスポーター阻害による ATV 経口投与後の血中曝露の上昇、の二つの薬物間相互作用に関して同位体 *iv* 法を用いた検討を行い、いずれの場合にも薬物の吸収過程および消失過程両方のパラメータが変動することを明らかとした。これらの結果は、経口剤の薬物間相互作用を理解する上で、その体内動態に関わる複数の変動要因を考慮することの重要性を意味しており、同位体 *iv* 法はその要因解析に有用であることが実証された。

シクロスポリン(CsA) は、臓器移植手術後の拒絶反応を抑制するための免疫抑制剤として世界的に繁用されている薬剤であり、患者の病状によっては複数の薬剤との併用を余儀なくされる。CsA はそれ自身が CYP3A4 および P-gp の基質である一方、それらの強い阻害剤となることが知られている。さらに一連の OATP トランスポーターに対しても阻害効果を示すことから、これまで臨床的に多くの薬物間相互作用が認められている。特に、第2章で用いた ATV を始めとしたスタチン系薬剤との併用によって、スタチン系薬剤の血中曝露が有意に上昇し、横紋筋融解症などの重篤な有害事象が発現した例が報告されている⁷⁰⁻⁷³⁾。スタチン系薬剤のうち、ATV、シンバスタチン、ロバスタチン等は CYP3A4 の基質であるため、当初は CsA による CYP3A4 の阻害がその血中曝露上昇の要因とされてきた。しかしながら、グルタチオン抱合を受けるプラバスタチン、あるいは CYP2C9, 2C19 で代謝されるフルバスタチンの様に、CYP3A4 の基質とならない薬剤でも CsA 併用によって同様な相互作用が認められることから⁷⁴⁾、現在では OATP を介した肝取り込みの阻害が相互作用の主たる要因と考えられている⁷⁵⁾。スタチン系薬剤の多くは、OATP1B1 によって効率的に肝臓へ取り込まれて血中から消失することが知られており^{76, 77)}、ATV の場合には、その後投与量の 90%が未変化体もしくは代謝物として糞中に排泄される⁷⁸⁾。

第1章、2章においては、前臨床段階での動態試験及び相互作用試験への同位体 *iv* 法の応用を目的として、小動物であるラットを用いた検討を行ってきた。実際の医薬品開発においては、小動物での検討に基づいて絞り込まれた新薬候補化合物について、さらにイヌ、サル等の大動物を用いた試験が実施される。そこでは、各化合物の動態的特徴に関する要因解析のみでなく、ヒトにおける体内動態や相互作用の予測が試みられる。そこで本章では、同位体 *iv* 法の大動物試験への応用の可能性を明らかにすることを目

的として、ATV (Fig. 14(a)) と CsA (Fig. 22) の薬物間相互作用について、ラットおよびイヌにおける速度論的な解析を行った。さらに、両動物の結果を比較することによって薬物間相互作用の動物間種差を明らかにするとともに、ヒトへの外挿を試みた。

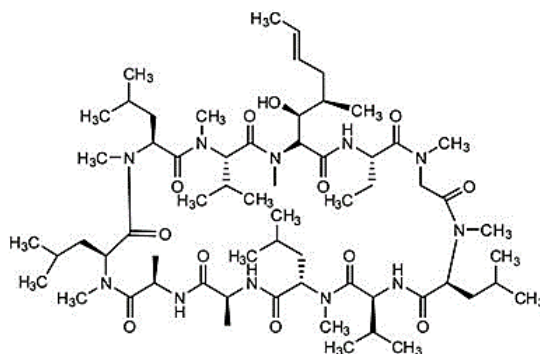


Fig. 22 Chemical Structure of CsA.

第1節 安定同位体 *iv* 法によるラット、イヌを用いた体内動態試験

同位体 *iv* 法を用い、ラットおよびイヌにおける ATV 経口投与後の血中濃度に及ぼす CsA 併用の影響に関して速度論的解析を行った。また、その結果からヒトでの相互作用を予測するため、これまで報告されている臨床例から得られたヒト PK パラメータと比較検討した。なお、臨床試験での投与条件と揃えるため、ラットおよびイヌへの薬物投与は、市販の臨床製剤リピトール錠® (ATV、ラット、イヌの場合は粉砕して使用)、ネオーラル内用液® (CsA) を用いた。ATV の重水素標識体は第2章と同じく ATV-d5 を使用した (Fig. 14(b))。

3.1-1) FaSSIF 中での ATV 溶解度

第1章、2章において、薬物の吸収過程 ($F_a \cdot F_g$) の変動要因として、消化管内での溶解性が大きく影響することを示唆した。そこで、ラット、イヌおよびヒト消化管内での ATV の溶解性の違いを明らかにするため、それぞれの消化管内モデル溶液中での ATV の溶解度を測定した。

経口投与後の薬物吸収の主たる部位である小腸管腔内での溶解性を調べるため、ラット、イヌ、ヒトの絶食時の小腸内モデル溶液 (Fasted-State Simulating Intestinal Fluid; FaSSIF) 中での溶解度を求めた。小腸内溶液の組成は動物間で異なっており、特にラットでは胆嚢がなく胆汁が随時管腔内に分泌されていることから、胆汁酸濃度が

ヒトよりも顕著に高い⁷⁹⁾。

Table 11 Composition of intestinal luminal fluid of rat, dog and human FaSSIF which include these concentrations of bile acid (sodium taurocholate) and lipid (phosphatidylcholine) and is adjusted pH to 6.5.

| | Rat | Dog | Human |
|-----------|--------|---------|---------|
| Bile acid | 50 mM | 5 mM | 3 mM |
| Lipid | 3.7 mM | 1.25 mM | 0.75 mM |

Rat FaSSIF、dog FaSSIF、human FaSSIF 中での ATV の溶解度はそれぞれ 829 ± 18 , 88.7 ± 4.9 , $75.9 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ であり、小腸内溶液の組成の違いに起因して ATV の溶解性にも種差が認められた。特にラット小腸内溶液では胆汁酸濃度が高いため、イヌ、ヒトに比べて 10 倍程度の高い溶解度を示すことが明らかとなった。しかしながら、いずれの FaSSIF 中の溶解度も、今回の ATV の投与量から換算した小腸内濃度（ラット $90 \sim 140 \mu\text{g/mL}$ 、イヌ $70 \sim 75 \mu\text{g/mL}$ ）よりも高いことから⁸⁰⁾、溶解性の違いが薬物間相互作用の動物間種差に影響を及ぼしている可能性は低いと考えられた。

3.1-2) ATV の Rb 値の測定

ラットおよびイヌの血液に ATV を添加し、下記の式に従って Rb 値を算出した。

$$Rb = Cb/Cp \quad (14)$$

Cb は血液中濃度、Cp は血漿中濃度を示す。血球移行に時間の影響は認められず、ATV の Rb 値はラット、イヌでそれぞれ 1.32、0.85 となった。

3.1-3) 安定同位体 iv 法によるラットにおける薬物間相互作用の解析

ATV の臨床投与量は $10 \sim 40 \text{ mg/man}$ であり、ヒトにおける相互作用試験では 10 mg/man の投与量がいわれている⁸¹⁾。しかし、この投与量を体重換算してラットに投与した場合 ($10 \text{ mg/man} \div 0.16 \text{ mg/kg}$)、得られる血中濃度が定量限界以下となる可能性が考えられた。そこで、本検討における ATV の投与量は、臨床用量の最大値を超えない用量として 0.5 mg/kg に設定した。また、CsA の投与量はヒトと同じく 5.2 mg/kg とした。ATV のみ、もしくは ATV と CsA をラットに経口投与し、その 90 分後に ATV-

d5 (0.005 mg/kg) を静脈内投与し、それぞれの血中濃度を測定し各 PK パラメータを算出した。

コントロール群および CsA 併用群での個体ごとの ATV の血中濃度推移を Fig. 23 に示す。また Fig. 24 には静脈内投与した ATV-d5 の血中濃度推移の平均値を示す。なお、コントロール群、併用群ともそれぞれ 4 匹のラットを用いて検討を行ったものの、コントロール群のうちの一匹のラット (No.4) の ATV 血中濃度が他の 3 匹と比較して極端に高くなったため、Thompson の棄却検定を行った上で除外した。Fig. 23(b) に示されたように、CsA 併用により経口投与後の ATV 血中濃度は明らかに上昇した。ATV および ATV-d5 の血中濃度をもとに算出した AUC_{po} と CL_{tot} を Table 12 に示す。CsA 併用群では AUC_{po} は 9.8 倍上昇し、この時、静脈内投与後の ATV-d5 の消失が遅延したため (Fig. 24)、 CL_{tot} は CsA 併用により約 1/2 に低下した。また、CsA 併用時の経口投与後の ATV 血中濃度には、極めて大きな個体間のばらつきが認められた (Fig. 23(b))。

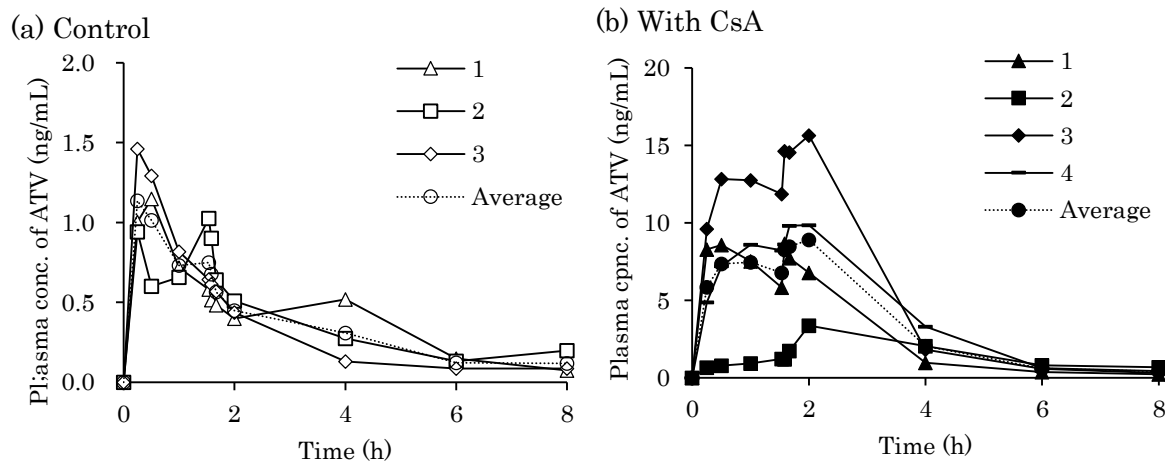


Fig. 23 Individual plasma concentration of ATV in (a) ATV group (control) and (b) ATV with CsA group.

Dose of ATV and CsA were 0.5 mg/kg and 5.2 mg/kg, respectively. In the figure, solid line represents the concentration in each rat and dotted line represents the average.

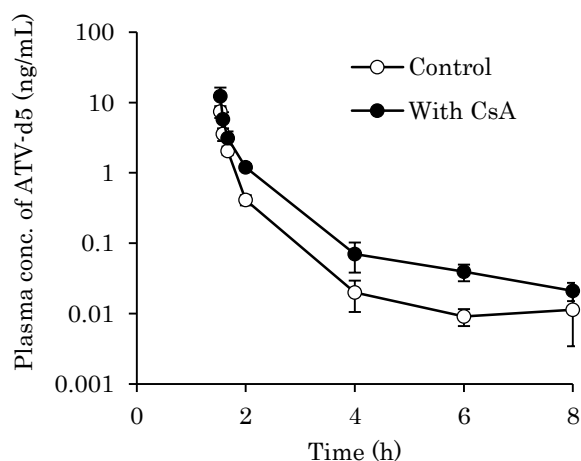


Fig. 24 Plasma concentration of intravenously administered ATV-d5 at 90 minutes after oral administration of ATV to rats.

Open symbol represents the concentration in ATV group (control) and closed symbol represents that in ATV with CsA group.

Table 12 AUC_{po} after oral administration of ATV and CL_{tot} after intravenous administration of ATV-d5 to rats in ATV group and ATV with CsA group.

| | AUC_{po} (ng · h/mL) | CL_{tot} (L/h/kg) |
|----------|------------------------|---------------------|
| Control | 2.89 ± 0.33 | 2.25 ± 0.30 |
| With CsA | 28.4 ± 13.8 | 1.09 ± 0.17 |

3.1-4) 安定同位体 iv 法によるイヌにおける薬物間相互作用の解析

次に、経口投与後の ATV の血中濃度推移に及ぼす CsA 併用の影響について、イヌにおいて同位体 iv 法による解析を行った。今回の試験には雄性のビーグル犬 4 匹を用い、まずコントロール試験として ATV 経口+ATV-d5 (静脈内) 投与実験を行い、その後 1 週間の wash out 期間を設けた後、cross over 試験として CsA 併用実験を行った。ATV, ATV-d5, CsA の投与量 (mg/kg) はすべてラットと同じとした。

Fig. 25 に経口投与後の個体ごとの ATV 血中濃度を示した。Fig. 25(a) のコントロール試験に比べて、(b) の CsA 併用試験ではいずれの個体の ATV 血中濃度も明らか

に上昇し、 AUC_{po} はコントロールの31倍であった (Table 13)。また、Fig. 26 に示したように、静脈内投与後の ATV-d5 の血中からの消失も明らかに遅延し、CsA 併用によって CL_{tot} は約 1/3 に低下した。

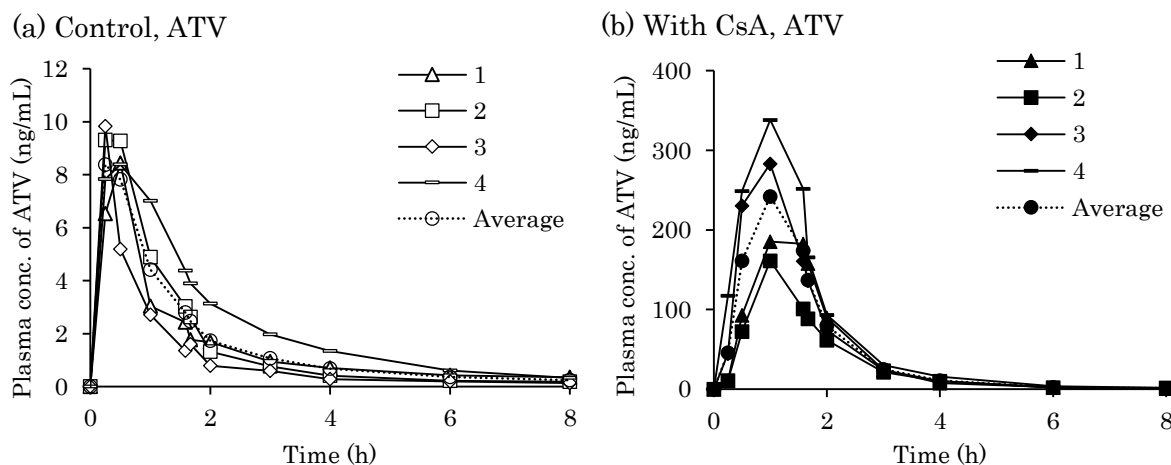


Fig. 25 Individual plasma concentration of ATV in (a) ATV group (control) and (b) ATV with CsA group.

Dose of ATV and CsA were 0.5 mg/kg, and 5.2 mg/kg, respectively. In the figure, solid line represents the concentration in each dog and dotted line represents the average.

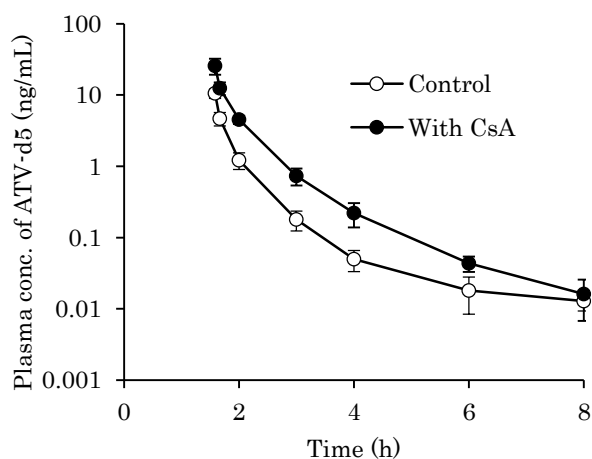


Fig. 26 Plasma concentration of intravenously administered ATV-d5 at 90 minutes after oral administration of ATV to dogs.

Open symbol represents the concentration in ATV group (control) and closed symbol represents that in ATV with CsA group.

Table 13 AUC_{po} after oral administration of ATV and CL_{tot} after intravenous administration of ATV-d5 to dogs in ATV group and ATV with CsA group.

| | AUC _{po} (ng · h/mL) | CL _{tot} (L/h/kg) |
|----------|-------------------------------|----------------------------|
| Control | 12.5 ± 3.9 | 1.70 ± 0.34 |
| With CsA | 386 ± 127 | 0.59 ± 0.12 |

3.1-5) PK パラメータの解析

得られた血中濃度をもとに、式(2)~(6)を用いてラット、イヌの各 PK パラメータを算出した。さらに、ATV の肝クリアランスが well-stirred モデルに従うとして、その肝固有クリアランス CL_{h,int} を式(7)より算出した。なお ATV の f_b 値として、ラットでは 0.047⁵⁸⁾、イヌでは f_p が 0.0355 と報告されていることから f_b=f_p/R_b により算出した値 (0.042) を用いた⁸²⁾。

今回の実験によって得られたラット、イヌの ATV に関するすべての PK パラメータを Table 14 にまとめた。また、比較のために臨床試験報告から得られたヒトのパラメータも同時に示した。コントロール試験におけるラット、イヌの CL_{h,int} は、Watanabe らによって報告されている値とおおよそ合致するものであり、本試験の妥当性が確認された。またこれらの値はヒトに比べると 10 倍以上高く、ラット、イヌでは ATV に対する肝臓の処理能力が高いことが示唆された⁵⁸⁾。一方、吸収過程に関するパラメータである F_a · F_g は、ラットにおいて 0.037 と顕著に低くなったのに対し、イヌではヒトとほぼ同程度であった。逆に、F_h はイヌで最も低くなったことから、ラットでは消化管が、イヌでは肝臓が ATV の体内への吸収の主たるバリアとしての役目を担っているものと推察された。ヒトの F_a · F_g はイヌに、F_h はラットに近い値であったことから、結果としてヒトの BA (F) は 14 % と最も高くなった。

Table 14 Pharmacokinetic parameters of orally administered ATV with or without CsA in each animal and ratio.

| | Control | | | With CsA | | | Ratio | | |
|---------------------------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-----------|-----------------------|-------|------|-------------------|
| | Rat | Dog | Human | Rat | Dog | Human | Rat | Dog | Human |
| AUC _{po} (ng*h/mL) | 2.89±0.33 | 12.5±3.9 | 26±15 ^{SD} | 28.4±13.8 | 386±127 | 226±111 ^{SD} | 9.8 | 31.0 | 8.7 ^{SD} |
| CL _{tot} (L/h/kg) | 2.25±0.30 | 1.70±0.34 | 0.54 ^{SS} | 1.09±0.17 | 0.59±0.12 | NA | 0.49 | 0.35 | NA |
| F | 0.017±0.002 | 0.036±0.011 | 0.14 ^{SS} | 0.080±0.040 | 0.38±0.09 | NA | 4.7 | 10.5 | NA |
| F _a *F _g | 0.037±0.008 | 0.16±0.11 | 0.24 ^{SS} | 0.11±0.05 | 0.50±0.12 | NA | 2.9 | 3.1 | NA |
| F _h | 0.47±0.072 | 0.29±0.14 | 0.58 ^{SS} | 0.74±0.04 | 0.75±0.05 | NA | 1.6 | 2.6 | NA |
| CL _{h,int} (L/h/kg) | 106±28 | 186±126 | 11 ^{SS} | 31.6±6.7 | 19.1±5.4 | NA | 0.30 | 0.10 | NA |

Human data were quoted from previous reports 81, 83).

F, F_h, F_a • F_g and CL_{h,int} values were calculated by equations (2)-(6) in each

rat.

一方 CsA を併用した場合、ラット、イヌどちらにおいても AUC_{po} , F , F_h , $F_a \cdot F_g$ は上昇し、 CL_{tot} , $CL_{h,int}$ は低下した。ATV 経口投与後の血中曝露の指標である AUC_{po} は、ラット、ヒトではそれぞれ約 9.8 倍、約 8.7 倍に上昇したのに対し、イヌでは約 31 倍と上昇率が最も大きく、CsA 併用による薬物間相互作用の程度に明らかな種差が認められた。 AUC_{po} の変化に種差が認められた要因として、 $F_a \cdot F_g$ の変化はラットとイヌでそれぞれ約 2.9 倍、約 3.1 倍とほぼ同程度であったことから、消化管における吸収過程に差はなく、門脈へ吸収された後の肝臓での処理能力の変化に違いがあったものと推察された。実際 Table 13 において、 $CL_{h,int}$ 値は、CsA 併用によってラットで約 1/3 に低下したのに対し、イヌでは約 1/10 まで大きく低下していることが確認された。

3.1-6) 考察

新規医薬品開発において、前臨床での動物試験で認められた薬物間相互作用が臨床において有意であるか否かを判断するためには、ヒトにおける相互作用の程度を定量的に予測することが重要となる。ATV をはじめとしたスタチン系薬剤と CsA の薬物間相互作用について、これまで主として CYP3A4 および OATP の阻害に起因することが明らかにされているものの、CsA 併用時のスタチン系薬剤の血中曝露量の変化について、ヒトを含めた動物間での違いを定量的に評価した報告はほとんど提出されていない。そこで本節では、ATV 経口投与後の血中曝露に及ぼす CsA 併用の影響をラット、イヌにおいて定量的に解析することを目的として、同位体 *iv* 法を用いた検討を行った。さらに、ATV と CsA の薬物間相互作用に関する臨床報告と比較することによって、ヒトでの相互作用の予測を試みた。

ラット、イヌどちらにおいても CsA との併用によって ATV 経口投与後の血中曝露の指標である AUC_{po} は大きく上昇し、その程度はラット、ヒトではそれぞれ約 9.8 倍、約 8.7 倍であったのに対し、イヌでは約 31 倍と上昇率が最も大きく、CsA 併用による薬物間相互作用の程度に明らかな種差が認められた。ATV は主に肝臓での代謝・胆汁排泄によって体内から消失するため、腎クリアランスは無視できるものとし、さらに肝クリアランスが well-stirred モデルに従うとすると、 AUC_{po} は下式(12) (第 2 章) によって表される。

$$\begin{aligned}
AUC_{po} &= F_a \cdot F_g \cdot \frac{Q_h}{Q_h + f_b \cdot CL_{h,int}} \cdot Dose \cdot \frac{Q_h + f_b \cdot CL_{h,int}}{Q_h \cdot f_b \cdot CL_{h,int}} \\
&= F_a \cdot F_g \cdot \frac{Dose}{f_b \cdot CL_{h,int}} \tag{12}
\end{aligned}$$

ここで、ATV の血中タンパク結合率は CsA に影響されないため f_b は一定の値である。また、コントロール群と CsA 併用群の投与量 (Dose) は同じであるため、式(12)から ATV の薬物間相互作用の程度、すなわち AUC_{po} の変動の大きさは、 $F_a \cdot F_g$ と $CL_{h,int}$ のバランスによって決定される。Table 14 において、CsA 併用による ATV の吸収過程 ($F_a \cdot F_g$) の変化はラット、イヌともほぼ 3 倍程度であったことから、イヌにおいて AUC_{po} の上昇率がラットよりも有意に大きかった理由として、 $CL_{h,int}$ がコントロールの 1/10 まで低下したため (ラットでは 1/3) と考えられた。

Kusuhara らは、薬物の肝細胞内への取り込み、血中への排出、肝細胞内での代謝、未変化体および代謝物の胆汁排泄の各過程が平衡状態であるとしたモデルを構築し (Fig. 27)、肝固有クリアランス ($CL_{h,int}$) が下式(15)で表されることを示した⁸⁴⁾。

$$CL_{h,int} = \frac{PS_{inf} (PS_{int,bile} + CL_{int,met})}{PS_{eff} + (PS_{int,bile} + CL_{int,met})} \tag{15}$$

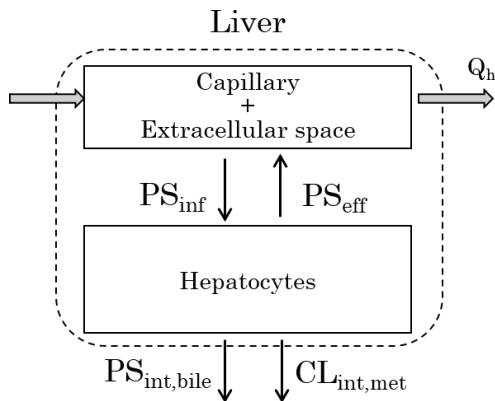


Fig. 27 Hepatic intrinsic clearance composed by intrinsic uptake clearance (PS_{inf}), sinusoidal efflux clearance (PS_{eff}), clearance for the biliary excretion ($PS_{int,bile}$), and metabolic clearance ($CL_{int,met}$). CL_{int} represents the amount of $PS_{int,bile}$ and $CL_{int,met}$.

ここで PS_{inf} 、 PS_{eff} はそれぞれ血中から肝細胞内への取り込みおよび肝細胞から血中への排出を表すクリアランス、 $PS_{int,bile}$ は胆汁排泄クリアランス、 $CL_{int,met}$ は肝細胞内での代謝固有クリアランスを示している。胆汁排泄と代謝固有クリアランスの和を CL_{int} とおくと ($PS_{int,bile} + CL_{int,met} = CL_{int}$)、式(15)は以下のようなになる。

$$CL_{h,int} = \frac{PS_{inf} \cdot CL_{int}}{PS_{eff} + CL_{int}} \quad (16)$$

式(16)より、肝固有クリアランスの律速過程に関して以下のような考察が可能である。

① 肝臓から血中への排出クリアランスが肝臓内での代謝、胆汁排泄クリアランスよりも十分遅い場合 ($PS_{eff} \ll CL_{int}$)、右辺の分母は $PS_{eff} + CL_{int} \approx CL_{int}$ と近似されるため、肝固有クリアランスは式(17)に示す様に、薬物の肝細胞内への取り込みクリアランスに律速される。

$$CL_{h,int} \approx PS_{inf} \quad (17)$$

② 逆に肝臓内での代謝、胆汁排泄クリアランスが血中への排出クリアランスよりも遅い場合 ($PS_{eff} \gg CL_{int}$)には、肝固有クリアランスは式(18)に近似される。

$$CL_{h,int} \approx \frac{PS_{inf} \cdot CL_{int}}{PS_{eff}} \quad (18)$$

さらに、薬物の肝臓への取り込みと肝臓からの排出がいずれも受動輸送によるとすると、 $PS_{inf} = PS_{eff}$ となり、式(18)は $CL_{h,int} \approx CL_{int}$ とみなせるため、肝固有クリアランスは代謝と胆汁排泄のクリアランスの和にほぼ等しくなる。

Watanabe らは ATV の肝クリアランスの律速過程を検討するため、ラットに ATV を静脈内投与した後の血中濃度推移に基づいて ATV の肝固有クリアランス ($CL_{h,int}$) を算出したところ、肝細胞を用いた *in vitro* 取り込み実験より得られた肝取り込みクリアランス (PS_{inf}) とほぼ同じ値となることを見出し、ATV の $CL_{h,int}$ は式(17)の様に肝取り込み過程によって律速されることを明らかとした⁵⁸⁾。また、ヒト臨床試験の結果から、ヒトにおいても肝取り込みが ATV の肝固有クリアランスの律速過程であり、その取り込みは OATP1B1 を介した能動輸送によることを明らかとした。これはプラバスタチンやピタバスタチンなどの他のスタチン系薬剤についても同様であった。

したがって、ラットとイヌにおいて CsA 併用による $CL_{h,int}$ 低下の程度に差が認められた理由として、ATV の肝取り込みに関与する OATP トランスポーターに対する阻害効果が異なっていた可能性が考えられる。Li らは、ヒト、イヌ、サル、ラットの肝臓に発現している全トランスポーターに占める各トランスポーターの割合を測定し、OATP トランスポーターの発現はイヌで約 69%と最も高く、ラットでは約 43%、ヒトでは約 29%であることを報告している⁸⁵⁾。さらに ATV は、ラットでは OATP family のうちの Oatp1a4 と 1b2 によって、イヌでは Oatp1b4 によって肝臓に取り込まれる

ことから^{86, 87)}、ATVの肝取り込みトランスポーターの発現量はラットでは全トランスポーターの約32% (Oatp1a4+1b2)、イヌでは約46% (Oatp1b4)、ヒトでは約12% (OATP1B1)を占めることになる。肝臓における各トランスポーターの正確な発現量を動物ごとに算出するためには、それぞれの肝臓の総タンパク質の見積もりが必要であるものの、以上の情報から、イヌではATVの肝取り込みに関わるOatp1b4トランスポーターの発現量がラットやヒトに比べて相対的に高く、その結果、Table 14からも明らか様に $CL_{h,int}$ が最も高くなったものと考えられた。Kellickらは、スタチン系薬剤と他の薬物との併用による薬物間相互作用についての臨床報告をまとめ、スタチン系薬剤の臨床使用上の注意に関する指針を発表している⁸⁸⁾。そのなかで、ATVとCsAを併用した場合、ヒトにおけるATVの AUC_{po} は8倍程度上昇し、そのうち肝臓のOATP1B1の阻害によって生じる上昇は約3.2倍であると予測している。本実験では、ラットにおいてATVの AUC_{po} が約9.8倍上昇し、そのうち肝臓OATP阻害の寄与として、 F_h の上昇(約1.6倍)と CL_h の低下(約0.49倍)の二つの要因を併せると約3.2倍の上昇が予測される。これは、Kellickらのヒトにおける予測と質的・量的にはほぼ一致する結果であり、肝臓のOATPトランスポーターを介した薬物間相互作用を検討する上で、ラットはヒトモデルとして適した実験動物であることが示唆された。

一方、今回の検討では $F_a \cdot F_g$ の変動はラットとイヌで同程度であったものの (Table 14)、吸収過程の変動も薬物間相互作用における種差を生み出す要因の一つと考えられる。第2章では、ラット経口投与後のATVの $F_a \cdot F_g$ がRIF併用によって約4~6倍上昇することを明らかにし、その主たる要因として、消化管上皮細胞に発現しているBCRPをRIFが阻害したためと推察した。Kellickらは、ヒトにおけるATVの吸収過程の変動についても考察を加えており、CsAが消化管上皮細胞のBCRPを阻害することで、経口投与後のATVの AUC_{po} は約1.72倍上昇し、同じく消化管上皮細胞のCYP3A4の阻害によって1.45倍上昇すると予測している。したがって、ヒトにおいてはCsAの併用によってATVの $F_a \cdot F_g$ が約2.5倍上昇すると考えられる。これは、本実験の結果とほぼ同程度であり、ラットおよびイヌにおいてもCsAがBCRPによる排出とCYP3A4による代謝を阻害したことによってATVの $F_a \cdot F_g$ が上昇したことが示唆された。ただし、ATVはP-gpの基質でもあることから、CsAによるP-gp阻害も F_a の上昇に寄与している可能性がある。Kageyamaらは、ラットの空腸にP-gpの基質であるRhodamine 123もしくはエリスロマイシンをCsAと併用投与した後の門脈中濃度を測定した結果、10 μ MのCsA併用投与時に、両薬物の門脈中濃度の上昇を認め、

これは消化管の P-gp が CsA によって阻害されたためであると考察している⁸⁹⁾。この CsA 濃度は、本実験で用いた CsA の消化管内濃度よりも低いと考えられることから、 F_a の上昇には BCRP のみでなく、P-gp の阻害も関与している可能性も無視できない。その他、MRP2 を始めとした他のトランスポーターについてもより網羅的な検討が必要と考えられる。

第 2 節 阻害剤の血中濃度の影響

第 2 章において、薬物間相互作用の程度が、阻害剤の血中濃度変動に大きく依存することを明らかとした。そこで本章においても、阻害剤である CsA の血中濃度を同時に測定し、個体ごとの ATV 血中濃度推移、および各 PK パラメータとの関係性について検討した。

3.2-1) 阻害剤の血中濃度が ATV 血中濃度におよぼす影響

ラットの CsA 併用群における経口投与後の ATV および CsA の、個体ごとの血中濃度推移を Fig. 28 に示す。各個体の ATV 血中濃度は、No.1 (▲) を除いた 3 匹では CsA の血中濃度の順位と対応しており、ATV と CsA の血中濃度に一定の関連性が示唆された。また、経口投与後の CsA の血中濃度は個体間差が大きく (Fig. 28(b))、特に ATV 濃度がほぼ C_{max} となる投与 2 時間後の CsA 血中濃度には、305~2045 ng/mL と顕著なばらつきが認められた。したがって、ATV の血中濃度推移のばらつきが、コントロール群よりも大きくなった理由として、CsA の血中濃度に大きな個体間差がみられたことがその要因の一つと考えられた。

一方、イヌでは経口投与後の CsA 血中濃度推移にラットほどばらつきはなく (Fig 29(b))、それを反映して ATV 血中濃度推移のばらつきも少なく、おおよそ同じレベルを推移した。また、ATV 血中濃度も CsA の血中濃度の順位とほぼ対応する結果であった。

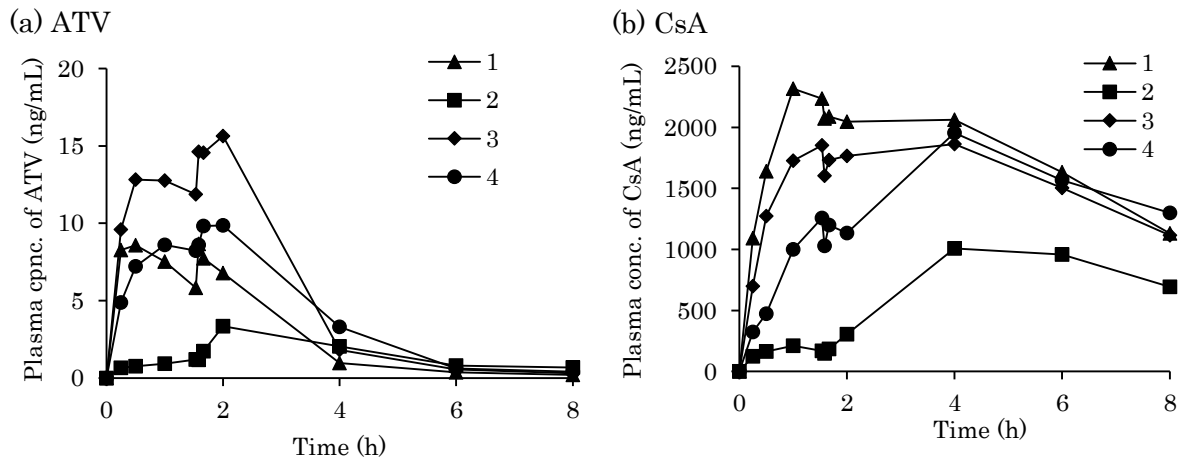


Fig. 28 Individual plasma concentration of orally administered (a) ATV and (b) CsA to rats. The same symbols defined in Fig. 23(b) are used for each rat.

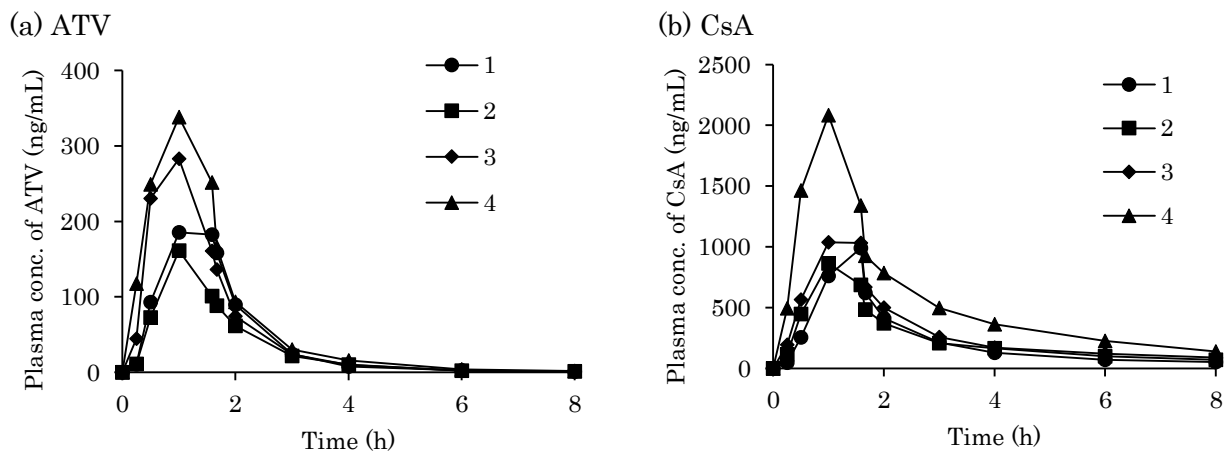


Fig. 29 Individual plasma concentration of orally administered (a) ATV and (b) CsA to dogs. Same symbols defined in Fig. 25(b) are used for each dog.

3.2-2) 阻害剤の血中濃度と PK パラメータとの関係性

ラット、イヌともに CsA 血中濃度が ATV の血中濃度推移に影響を及ぼしている可能性が示唆されたため、個体ごとに CsA の AUC_{po} を算出し、ATV の吸収および消失に関する PK パラメータとの関係性について検討を行った。

Fig. 30 にラットにおける ATV の F , $F_a \cdot F_g$ および $CL_{h,int}$ と CsA の AUC_{po} との関係を示す。グラフ中のすべてのシンボルは血中濃度のグラフ (Fig. 23) の各個体と対応し

ている。なお、コントロール群の CsA の AUC_{po} は 0 と見なしてすべて y 軸上にプロットした。コントロール群 3 匹、CsA 併用群 4 匹の計 7 点について最小二乗法により相関係数 R^2 値を求めた。また、7 点で無相関の検定を行い、得られた r 値、 p 値も同様に示している。無相関の検定で算出された p 値から、ラットでは F , $F_a \cdot F_g$, および $CL_{h,int}$ すべてで CsA の AUC_{po} と有意な相関が認められた。

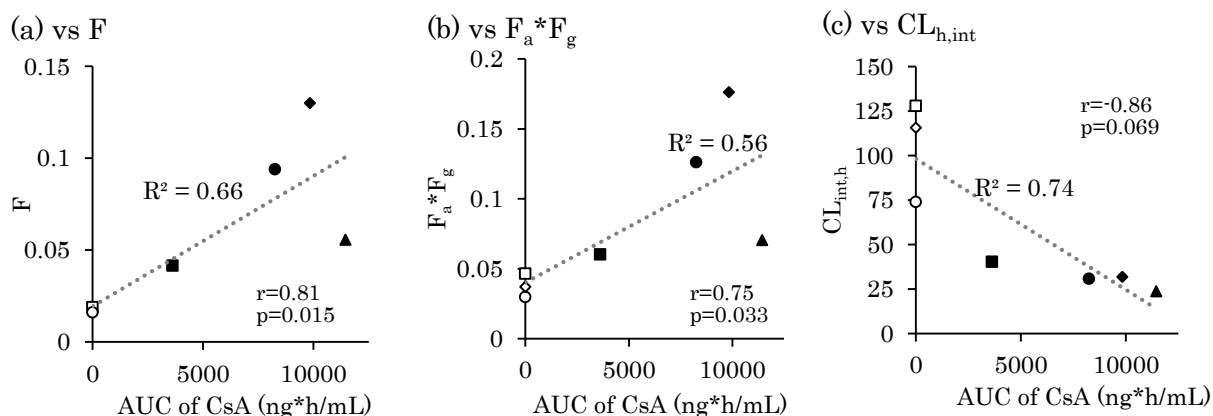


Fig. 30 Correlation of plasma AUC of CsA to (a) F , (b) $F_a \cdot F_g$, and (c) $CL_{h,int}$ values of ATV in rats.

In each figure, dotted line represents regression line obtained by a least-square analysis. Open symbol on the vertical axis represents the value in control and closed symbol represents the value in ATV with CsA group. Significance of the correlation was analyzed by the Test of Non-correlations (correlated t-test) and p values of 0.05 or less were considered significant.

イヌについても同様に、コントロール群 4 匹、CsA 併用群 4 匹について F , $F_a \cdot F_g$, $CL_{h,int}$ と CsA の AUC_{po} との関係性を調べた。Fig. 31 に示す様に、イヌでは ATV の F , $F_a \cdot F_g$ に CsA の AUC_{po} との高い相関がみられたのに対し、 $CL_{h,int}$ は CsA の AUC_{po} によらず、併用群ではほぼ一定の値まで低下しており、有意な相関は認められなかった。

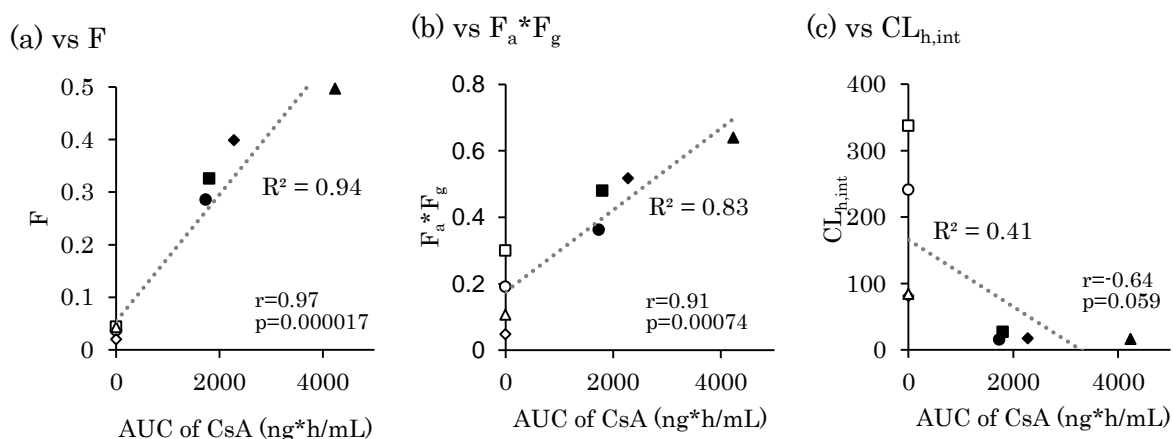


Fig. 31 Correlation of plasma AUC of CsA to (a)F, (b) $F_a \cdot F_g$, and (c) $CL_{h,int}$ values of ATV in dogs.

In each figure, dotted line represents regression line obtained by a least-square analysis. Open symbol on the vertical axis represents the value in control and closed symbol represents the value in ATV with CsA group. Significance of the correlation was analyzed by the Test of Non-correlations (correlated t-test) and p values of 0.05 or less were considered significant.

3.2-3) 考察

同位体 *iv* 法では、対象とする薬物と同時に阻害剤の血中濃度を測定することにより、相互作用の程度と阻害剤の血中濃度との関係について個体ごとの検証が可能である。今回の検討において、CsA 経口投与後の血中濃度推移には個体間で極めて大きなばらつきが認められ、また阻害剤の血中濃度に依存して ATV の血中曝露が変化することが明らかとなった。この傾向は特にラットにおいて顕著であり、投与 2 時間後の CsA 血中濃度には個体間で 7 倍程度の差が検出された (Fig. 27)。イヌにおける CsA 濃度推移の個体間変動はラットに比べて小さかったものの、やはり ATV の血中濃度の変化率と一定の関係が認められた。

CsA は水に対する溶解度が低く、また消化管において P-gp による排出輸送、および CYP3A4 による初回通過代謝を受ける。そのため、臨床においても経口投与後の BA は低く (10-30%程度)、またこれらトランスポーターや酵素の活性の違いによって血中濃度に大きな個体間差を生じることが知られている^{90, 91)}。難溶解性の問題に関しては、自己乳化型の脂質分散系製剤であるネオーラル内用液 (Neoral®) が開発され、それま

での製剤 (Sandimmune®)に比べて、BA およびそのばらつきが改善されている。今回、ラット、イヌともに CsA の経口投与にはネオオーラル内用液を用いたものの、その血中濃度のばらつきはラットにおいて特に大きかった。その理由として、Table 14 にも示したように、ラットの $F_a \cdot F_g$ がイヌ、ヒトの 1/5 程度と低いことが挙げられる。これは、ラットの消化管は P-gp や CYP 酵素の活性が高く、CsA の様な薬物の体内への吸収を阻止するための強いバリアとして機能していることを意味しており、個体間でのバリア機能の程度の違いが CsA の吸収率に大きな影響を及ぼしたものと推察される。一方、イヌでは消化管のバリア機能が比較的弱く、CsA の吸収に対する影響も小さかったものと考えられる。Fig. 30, 31 において、ラットおよびイヌともに ATV の F 、 $F_a \cdot F_g$ と CsA の AUC_{po} との間に有意な正の相関が認められた。これは、阻害剤の血中濃度を測定しておくことによって、薬物間相互作用の程度を推定することが可能であることを示す結果と考えられる。特に、CsA の様にそれ自体の体内動態が大きな個体間変動を示す阻害剤の場合には、相互作用による有害事象の発現を回避する上で一つの指標となるものと期待される。

ラットにおいては、ATV の $CL_{h,int}$ と CsA の AUC_{po} との間にも有意な相関が認められ、肝臓の OATP トランスポーターも CsA の血中濃度依存的に阻害されることが示唆された。一方、イヌでは ATV の $CL_{h,int}$ は CsA の併用によって一定の値まで低下するものの、その程度は CsA の AUC_{po} には直接依存しないことが明らかとなった。その理由に関する明確な知見は得られていないものの、肝臓における OATP トランスポーターや CYP 酵素が強く阻害された結果、その取り込みクリアランス (PS_{inf}) や肝代謝固有クリアランス ($CL_{int,met}$) が大きく低下し、ATV の $CL_{h,int}$ の律速過程に変化が生じた可能性が考えられる (式(16), (17))。この点に関してはさらなる解析が必要であるものの、薬物間相互作用によって体内動態の律速過程が変化した場合には、対象となる薬物の血中濃度が予想とは異なる変化を示す可能性があることに注意が必要である。

以上、本章では、ATV 経口投与後の血中曝露に及ぼす CsA 併用の影響に関して、ラット、イヌにおいて同位体 *iv* 法を用いた速度論的な解析を行い、薬物間相互作用における動物間種差について検証を行った。さらに、同様な薬物間相互作用に関する臨床報告と比較することによってヒトとの違いについても解析を行い、相互作用を予測するための速度論的な手法およびそれに適した動物種についても考察を加えた。本結果は、薬物間相互作用に起因した有害事象の発現を回避する上で有用な知見になるものと期待される。

結論

以上、著者は薬物の体内動態を解析するための新たな試験法として、薬物の経口投与とその安定同位体標識体の微量静脈内投与を組み合わせた安定同位体 *iv* 法を考案し、新規医薬品開発における前臨床試験への適応性、有用性について 3 章にわたり検証を行った。その結果、薬物経口投与後の非線形体内動態および薬物代謝酵素／トランスポーターを介した薬物間相互作用の速度論的解析、さらに薬物間相互作用における動物間種差の同定とヒトへの外挿を行う上で、本手法が極めて有用であるとの結論を得た。

第 1 章 安定同位体 *iv* 法の構築と非線形体内動態の解析

安定同位体 *iv* 法（以下、同位体 *iv* 法）とは、薬物分子の一部を重水素などの非放射性同位体でラベル化した標識体を、薬物経口投与後に微量静脈内投与することによって、対象薬物の経口および静脈内投与後の PK パラメータを 1 回の試験で同時にかつ同じ個体から得ることを可能とする手法である。同位体 *iv* 法では、薬物とその標識体と同じ体内動態を示すことを前提としている。そこで、VER および TEL の 2 つの薬物について、重水素 (^2H) で置換した標識体の PK パラメータをそれぞれの非標識体と比較した。まず、VER とその重水素 6 置換体である VER-d6 について肝ミクロソームを用いた代謝実験を行ったところ、両化合物の代謝パターンは同等であった。また、VER と VER-d6 および TEL とその重水素 3 置換体である TEL-d3 をそれぞれラットに静脈内投与したところ、VER、TEL とともに標識体と非標識体の血中濃度推移に有意な差は認められなかったことから、両薬物の重水素標識体は同位体 *iv* 法に適用可能であることが確認された。

薬物の体内動態試験における同位体 *iv* 法の有用性を検証するため、TEL の非線形動態に関する速度論的な解析を試みた。4 群のラットに 0.1, 2, 6, 20 mg/kg の TEL を経口投与した後、TEL-d3 を 0.005 mg/kg 静脈内投与した。個々のラットにおいて、TEL の血中濃度推移より血中曝露量の指標となる AUC_{po} を、TEL-d3 の血中濃度推移より CL_{tot} 、 Vd 等の PK パラメータを算出した。その結果、TEL 経口投与後の血中濃度は投与量の増加に伴って上昇するものの、その関係は線形とはならず、シグモイド型の複雑な非線形性を示すことが明らかとなった。この時、TEL の門脈中への移行率 ($F_a \cdot F_g$) は、低用量 (0.1 ~ 6 mg/kg) では投与量とともに上昇し、高用量 (6 ~ 20 mg/kg) では逆に低下した。低用量域で $F_a \cdot F_g$ が上昇した理由としては、消化管に発現している P-

gp が飽和し、消化管上皮細胞から管腔中への排出輸送速度が低下したためと考えられた。また、高用量域での $F_a \cdot F_g$ の低下は、TEL の消化管内での溶解飽和に起因するものと推察された。

一方、TEL の CL_{tot} は投与量が 2 ~ 6 mg/kg の範囲で有意に低下した。TEL は肝臓に発現している OATP によって血中から効率的に肝臓に取り込まれるため、その CL_h は OATP トランスポーターを介した肝取り込み速度によって律速される。TEL の体内からの消失における尿中排泄の寄与は無視できることから ($CL_{tot} \doteq CL_h$)、その CL_{tot} が投与量の増加とともに低下した理由として、OATP による肝取り込みの飽和が主たる要因と考えられた。以上、経口投与後の薬物の吸収および体内からの消失に関する各過程を速度論的に解析する上で、同位体 *iv* 法は極めて有用な手法となることが示された。

第 2 章 薬物代謝酵素およびトランスポーターを介した薬物間相互作用の解析

本章では、第 1 章で得られた結果に基づき、同位体 *iv* 法を用いて経口剤の薬物間相互作用に関する速度論的な解析を試みた。まず代謝酵素を介した薬物間相互作用として、CYP3A4 の基質である VER と、CYP の非特異的阻害剤である ABT、および ITZ を併用した際の VER の体内動態の変化を観察した。同位体 *iv* 法では、VER の経口投与および VER-d6 の静脈内投与を阻害剤無／有の 2 群のラットを用いて行い、それぞれの血中濃度から VER の PK パラメータを算出した。その結果、ABT および ITZ の併用によって経口投与後の VER の AUC_{po} が上昇し、特に $F_a \cdot F_g$ に顕著な上昇が認められた。VER の CL_{tot} も阻害剤併用によって低下したもののその程度は約 20% と小さく、吸収過程での相互作用が血中曝露上昇の主たる要因であることが示唆された。また、ABT は P-gp 等のトランスポーターに対する阻害効果は有さないことから、消化管での代謝阻害による F_g の上昇が大きく寄与しているものと推察された。以上の結果は、経口投与と静脈内投与試験を別々に行う従来法を用いた場合と同様であったことから、同位体 *iv* 法を用いた薬物間相互作用解析の妥当性が確認された。さらに、同位体 *iv* 法では必要な動物の数が従来法の 1/2 に低減できること、および同一個体における吸収と消失過程を一度の試験で解析可能であることなどの点で、従来法に比べて優れた手法と考えられた。

次に、トランスポーターを介した薬物間相互作用として、OATP トランスポーターの基質であるアトルバスタチン (ATV) に、その阻害剤であるリファンピシン (RIF) を併用した時の ATV の体内動態の変化を同位体 *iv* 法により解析した。同位体標識体と

して、非標識体と同じ体内動態を示した重水素 5 置換体の ATV-d5 を用いた。その結果、RIF 併用により経口投与後の ATV の AUC_{po} は 25 倍にも上昇し、吸収率の上昇および消失速度の低下の二つの要因が関与していることが明らかとなった。また、個体ごとに求めた RIF の平均血中濃度と ATV の $F_a \cdot F_g$ 、 CL_{tot} 等の PK パラメータの間に有意な相関が認められたことより、阻害剤である RIF の吸収率のばらつきが、ATV の血中濃度推移の個体間変動の原因の一つであることが示唆された。これは、薬物間相互作用を解析する上で、阻害を受ける薬物のみでなく、阻害する側の薬物の体内動態にも十分な注意が必要であることを示唆する結果と考えられた。

第 3 章 薬物間相互作用における種差の検討およびヒトへの外挿

第 1 章、第 2 章において、同位体 *iv* 法がラットの様な小動物における体内動態試験に有用であることを示した。実際の医薬品開発では、小動物による試験の後、さらにイヌ、サル等の大動物を用いた試験を行い、ヒトへの外挿が試みられる。そこで本章では、ATV と CsA との薬物間相互作用について、ラットおよびイヌを用いた同位体 *iv* 法による試験を行い、薬物間相互作用の動物間種差を明らかにするとともに、ヒトへの外挿を試みた。

経口投与後の ATV および静脈内投与後の ATV-d5 の血中濃度推移に及ぼす CsA 併用の影響を観察したところ、ラット、イヌどちらにおいても CsA との併用により ATV の AUC_{po} は大きく上昇した。CsA 併用による ATV の血中曝露量の上昇率を臨床報告値と比較したところ、ラットとヒトはほぼ同程度 (9.8 倍、8.7 倍) であったのに対し、イヌでは 31 倍と顕著に大きく、相互作用の程度に明らかな種差が認められた。一般に、薬物経口投与後の AUC_{po} は、 $F_a \cdot F_g$ と、肝臓での消失能 ($CL_{h,int}$) とのバランスによって決定される。CsA 併用による ATV の $F_a \cdot F_g$ の上昇はラット、イヌともほぼ 3 倍程度であったのに対し、 $CL_{h,int}$ はイヌにおいて 1/10 程度にまで低下したことから (ラットでは 1/3 程度)、イヌでは OATP トランスポーターによる ATV の肝取り込み能が高く、それが CsA 併用によって大きく低下したことが AUC_{po} の顕著な上昇を引き起こしたと考えられた。これらの結果を臨床データと比較したところ、ヒトにおける ATV の AUC_{po} の上昇率は約 8 倍、肝臓の OATP の阻害による取り込み速度の低下は 1/3 程度と予測されたことから、肝臓の OATP トランスポーターを介した薬物間相互作用を検討する上で、ラットはヒトモデルとして適した実験動物であることが示唆された。

本検討においても、阻害剤である CsA 経口投与後の血中濃度推移には個体間で大き

なばらつきが認められ、さらにラット、イヌともに阻害剤の血中濃度に依存して ATV の AUC_{po} が変化することが明らかとなった。また、ATV、CsA とも血中濃度の個体間変動はラットにおいて特に顕著であり、その理由として、ラットの消化管は P-gp や CYP 酵素の活性が高く様々な薬物の吸収を阻止するための強力なバリアとして機能しており、個体間でのバリア機能の程度の違いが、これら薬物の吸収率に大きな影響を及ぼしたものと推察された。

以上、著者は 3 章にわたって、薬物の動態解析のための新たな手法としての安定同位体 *iv* 法の妥当性を検証するとともに、本手法が経口剤の相互作用を解析する上で多くの利点を有していることを示した。また本試験法は、ラットの様な小動物のみでなく、イヌなどの大動物にも応用可能であり、ヒトでの体内動態や相互作用を予測する上でも有用な手法であることを明らかにした。今後、本研究で得られた成果が新たな医薬品の開発に寄与するとともに、薬物間相互作用に起因した有害事象の発現を回避するための有用な知見となることを期待する。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇切なるご指導、御鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 薬剤学研究室 山下伸二 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益な御指導と御助言を頂きました摂南大学 薬学部 薬剤学研究室 片岡誠 准教授、東野晴輝 助教に感謝の意を表します。さらに、同位体標識体の定量に御協力頂きました株式会社 住化分析センター 牟田口国則 博士、富樫一天 博士に深く感謝致します。また、ビーグル犬の薬物動態実験に御協力頂きましたハムリー株式会社 赤荻誠一郎 博士、寺井孝雄 博士に深く感謝致します。また、実験の一部に御協力頂きました長谷川翼 博士、小嶋知恵 学士、植田和基 学士、立原真輝 学士、中川茉音 学士、山田裕介 学士、竹腰雄真 学士をはじめ、当研究室の卒業生ならびに在校生に深く感謝致します。

最後に、いつもよき理解者として励まし支えてくれた父、母、祖母、妹、弟をはじめ、親族、友人一同に心から感謝いたします。

2020年5月

南 景子

実験の部

第1章 安定同位体 *iv* 法の構築と非線形体内動態の解析

【1】実験材料

ベラパミル塩酸塩、アセトニトリル、ジメチルスルホキシドは和光純薬（株）、テルミサルタン、 β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH)はSigma Aldrich社から購入した。ベラパミル塩酸塩 d6 体はSanta Cruz Biotechnology社から、テルミサルタン d3 体はToronto Research Chemicals社から購入した。雄性 Wistar ラットの肝ミクロソームはXeno Tech社から、雄性 SD ラット、Wistar ラットは清水実験材料から購入した。

【2】ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験

(1) 各溶媒の調製

- ・ 3.3 mM MgCl₂ を含むリン酸緩衝液

3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM KH₂PO₄ 溶液と 3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM K₂HPO₄ 溶液を混合して、pH 7.4 の 3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM リン酸緩衝液を調製した。

- ・ NADPH

NADPH は 20 mM となるように、実験開始直前に上記の 3.3 mM MgCl₂ を含むリン酸緩衝液で溶解し、調製した。

- ・ VER、VER-d6

VER および VER-d6 は 100 nM となるようにメタノールに溶解した。

(2) 代謝反応液の調製

代謝実験の反応液の組成は以下の通りである。

| | |
|--|---------------|
| 3.3 mM MgCl ₂ を含む 100 mM リン酸緩衝液 | 452.5 μ L |
| VER もしくは VER-d6 (最終濃度 1 nM) | 5 μ L |
| 肝ミクロソーム (20 mg protein/mL、最終濃度 0.4 mg/mL) | 10 μ L |
| 20 mM NADPH (最終濃度 1.3 mM) | 32.5 μ L |
| <hr/> | |
| Total | 500 μ L |

(3) 実験手順

3.3 mM MgCl₂ を含む 100 mM リン酸緩衝液に VER もしくは VER-d6、および

肝ミクロソームを添加し、5 分間プレインキュベーションをした。そして 20 mM NADPH を添加し、反応を開始させた。NADPH 添加後 0、2、5、10、20、30、45、60、90、120 分に 20 μ L サンプリングし、直ちにアセトニトリル 180 μ L と混合し反応を停止させた。その後、15,000 rpm で 20 分遠心分離し、上清を LC/MS/MS 測定サンプルとした。

【3】 VER, VER-d6 ラット静脈内投与実験

(1) 試薬の調製

VER は 0.2 mg/mL になるように生理食塩水に溶解した。VER-d6 は 2 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈し、0.02 mg/mL とした。

(2) 実験手順

雄性の Wistar ラット (250~300 g) を実験開始 18 時間前から絶食、自由飲水状態とした。VER もしくは VER-d6 投与液を 0.5 mL/kg となるようにシリンジに充填し、頸静脈から急速投与した。投与後 2、5、10、30、60、120、240 分後にもう片方の頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

血漿サンプル 100 μ L とアセトニトリル 900 μ L を混合し、タンパクを除去した。ボルテックスで攪拌後、20°C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清 800 μ L を減圧下で蒸発乾固させた。このサンプルを 0.1 %ギ酸/アセトニトリル(50/50, v/v%) 混合溶液 100 μ L で再溶解した。十分に攪拌後、20°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離して不純物を沈殿させ、その上清を LC/MS/MS サンプルとした。

【4】 VER 経口投与、VER-d6 静脈内投与実験

(1) 試薬の調製

VER は 0.5 mg/mL になるように精製水に溶解した。VER-d6 は 2 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈し、0.01 mg/mL とした。

(2) 実験手順

VER 投与液を 2 mL/kg となるようにシリンジに充填し、経口投与用ゾンデを用いてラットに経口投与した。その 90 分後に VER-d6 (0.5 mL/kg, 0.005 mg/kg)を頸静脈から急速投与した。VER 経口投与後 15、30、60、92、95、100、120、210、240、330、360、480 分に頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

【3】(3) 参照。

【5】TEL, TEL-d3 静脈内投与実験

①高投与量群 TEL 1 mg/kg、TEL-d3 0.005 mg/kg

②低投与量群 TEL 0.005 mg/kg、TEL-d3 0.005 mg/kg

(1) 試薬の調製

①高投与量群：TEL、TEL-d3 をそれぞれ 2 mg/mL、0.01 mg/mL になるようジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解する。これを生理食塩水で希釈し、TEL 2.0 mg/mL、TEL-d3 0.01 mg/mL とした。

②低投与量群：TEL、TEL-d3 を共に 0.1 mg/mL になるよう DMSO で溶解し、生理食塩水で希釈して 0.01 mg/mL とした。

(2) 実験手順

高投与量群では、投与液 (TEL 2 mg/mL、TEL-d3 0.01 mg/mL) を 0.5 mL/kg になるようにシリンジに充填し、頸静脈から急速投与した。低投与量群も同様に、投与液 (TEL, TEL-d3 0.01 mg/mL) を頸静脈から急速投与した。その後、2、5、10、15、30、60、90、120、180、240 分にもう片方の頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

【3】(3) 参照。

【6】 安定同位体 iv 法を用いた TEL 薬物動態実験

- ①TEL 0.1 mg/kg、 TEL-d3 0.005 mg/kg
- ②TEL 2.0 mg/kg、 TEL-d3 0.005 mg/kg
- ③TEL 6.0 mg/kg、 TEL-d3 0.005 mg/kg
- ④TEL 20 mg/kg、 TEL-d3 0.005 mg/kg

(1) 試薬の調製

TEL を 0.05、1.0、3.0、10 mg/mL になるように生理食塩水に懸濁させ、経口投与の投与液とした。TEL-d3 は 0.2 mg/mL になるよう DMSO に溶解させたのち、生理食塩水で 0.01 mg/mL になるよう希釈した。

(2) 実験手順

ラット 16 匹を 4 群に分け、各濃度の投与液を 2 mL/kg になるようシリンジに充填し、経口投与用ゾンデを用いて投与した。TEL 経口投与 90 分後、TEL-d3 を頸静脈から急速投与した (0.5 mL/kg)。TEL 経口投与後、15、30、60、92、95、100、120、240、360、480 分に頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

【3】 (3) と同様。

【7】 薬物の定量

溶液サンプル中の薬物は、LC/MS/MS (ACQUITY®UPLC, Waters)により定量した。各薬物の LC, MS/MS condition は以下の通りである。

VER

<LC condition>

Column: Waters ACQUITY® UPLC BEH C18 column

(1.7µm particle size, 2.1 mm I.D. x 50 mm length)

Mobile Phase (A): 0.1%ギ酸を含む精製水

Mobile Phase (B): 0.1%ギ酸を含むアセトニトリル

Gradient Program: 0.0 min (A) 98 %, (B) 2 %

1.0 min (A) 5 %, (B) 95 %
2.0 min (A) 5 %, (B) 95 %
2.5 min (A) 98 %, (B) 2 %
3.0 min (A) 98 %, (B) 2 % End

Flow rate: 0.3 mL/min

Inject Volume: 5 μ L

Column Temperature: 40°C

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 544.377

Daughter m/z: 303.245

VER-d6

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 461.43

Daughter m/z: 309.302

TEL

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 10 eV

Parent m/z: 515.62

Daughter m/z: 193.14

TEL-d3

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 30 V

Collision energy: 10 eV

Parent m/z: 518.40

Daughter m/z: 279.17

【8】薬物動態解析

静脈内投与後の血漿中濃度推移から、`moment.xls` を用いて血漿中濃度時間曲線下面積 ($AUC_{iv, 0-\infty}$) および全身クリアランス (CL_{tot}) を算出した⁹²⁾。経口投与後の AUC_{po} は、台形公式により算出した。

【9】統計解析

すべてのデータは、それぞれの群における平均値を標準偏差とともに記載した。有意差は対のない Student の t 検定により評価し、 $p \leq 0.05$ で有意差ありとした。

第2章 薬物代謝酵素およびトランスポーターを介した薬物間相互作用の解析

【1】実験材料

リファンピシンは和光純薬（株）、1-アミノベンゾトリアゾール（ABT）は東京化成（株）、アトルバスタチン d5 体は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。雄性 Wistar ラット、雄性 SD ラットは清水実験材料から購入した。

【2】VER ラット経口・静脈内投与試験（従来法）

(1) 試薬の調製

VER 経口投与液は 0.5 mg/mL、ABT は 50 mg/mL になるように精製水に溶解した。VER 静脈内投与液は 0.2 mg/mL になるように生理食塩水に溶解した。

(2) 実験手順

コントロール群、ABT 投与群の 2 群について、それぞれ経口投与実験、静脈内投与実験を行う。ABT 投与群は VER 投与 18 時間前に投与液をあらかじめ 2 mL/kg となるように経口投与しておいた。静脈内投与試験（VER 0.1 mg/kg）では、薬液を頸静脈から急速投与し、投与後 2、5、10、30、60、120、240 分にもう片方の頸静脈から 0.4 mL 採血した。経口投与試験（VER 1 mg/kg）では、経口投与用ゾンデを用いて経口投与し、投与後 15、30、60、120、240、360、480 分に頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

第1章【3】(3)と同様。

【3】VER 経口投与・VER-d6 静脈内投与試験（安定同位体 iv 法）

(1) 試薬の調製

ABT および VER 経口投与液は【4】(1) 参照。VER-d6 は 2 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈し、0.01 mg/mL とした。ITZ は 1.5 mg/mL になるよう精製水に溶解した。

(2) 実験手順

コントロール群、ABT 投与群、ITZ 投与群の 3 群で実験を行った。ABT 投与群は VER 投与 18 時間前、ITZ 投与群は 1 時間前に各投与液をあらかじめ 2 mL/kg となるように経口投与しておいた。VER (1 mg/kg) をラットに経口投与し、その 90 分後に VER-d6 (0.005 mg/kg) を頸静脈から急速投与した。VER 経口投与後 15、30、60、92、95、100、120、240、360、480 分に頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

第 1 章【3】(3) 参照。

【4】ATV, ATV-d5 ラット静脈内投与実験

(1) 試薬の調製

ATV は 20 mg/mL になるように DMSO に溶解させ、生理食塩水で希釈して 0.2 mg/mL とした。ATV-d5 は 1 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈して 0.01 mg/mL とした。

(2) 実験手順

ATV (0.1 mg/kg) と ATV-d5 (0.005 mg/kg) を同時に頸静脈から急速投与した。投与後 2、5、10、30、60、120、240 分後にもう片方の頸静脈から 0.4 mL 採血した。血液サンプルは、直ちに 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を血漿サンプルとして保存した。

(3) 血漿サンプル処理

第 1 章【3】(3) 参照。

【5】ATV 経口・静脈内投与試験（従来法）

(1) 試薬の調製

ATV は 5 mg/mL になるように精製水に懸濁し、経口投与液とした。静脈内投与液として、ATV を 20 mg/mL になるように DMSO に溶解させ、生理食塩水で希釈して 0.2 mg/mL とした。RIF は水に懸濁させた後、5 mol/L の HCl を少量添加す

ることで 15 mg/mL になるように溶解させた。

(2) 実験手順

RIF 併用群は、ATV 投与 1 時間前にあらかじめ投与液を 2 mL/kg となるように経口投与しておいた。その後の実験手順は静脈内投与試験 (ATV 0.1 mg/kg)、経口投与試験 (ATV 10 mg/kg) とともに【2】(2) 参照。

(3) 血漿サンプル処理

第 1 章【3】(3) 参照。

【6】 ATV 経口投与・ATV-d5 静脈内投与試験 (安定同位体 iv 法)

(1) 試薬の調製

ATV-d5 静脈内投与液は 1 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈して 0.01 mg/mL とした。ATV, RIF の経口投与液は【5】(1) 参照。

(2) 実験手順

コントロール群 (ATV 10 mg/kg)、RIF 併用群 (ATV 10 mg/kg, RIF 30mg/kg) の 2 群で実験を行った。RIF は ATV 経口投与 1 時間前に投与液を 2 mL/kg となるようにあらかじめ経口投与しておいた。詳細は【3】(2) 参照。

(3) 血漿サンプル処理

第 1 章【3】(3) 参照。

【7】 薬物の定量

第 1 章と同様、LC/MS/MS (ACQUITY®UPLC, Waters)により定量した。

VER, VER-d6

第 1 章【7】 参照。

ATV

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 559.30

Daughter m/z: 340.21

ATV-d5

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 564.23

Daughter m/z: 445.07

RIF

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 824.38

Daughter m/z: 792.38

【8】薬物動態解析

第1章【8】参照。

【9】統計解析

第1章【9】参照。ピアソンの無相関の検定は、相関係数 (r) を算出し、その p 値が $p \leq 0.05$ で相関があると評価した。

第3章 薬物間相互作用における種差の検討およびヒトへの外挿

【1】実験材料

リピトール錠®はアステラス製薬（株）から、ネオーラル内用液®はノバルティスファーマ（株）から購入した。アトルバスタチンカルシウム三水和物は東京化成（株）、アトルバスタチン d5 体は Cosmo Bio 社から購入した。タウロコール酸ナトリウム、卵黄レシチンは和光純薬（株）から購入した。ビーグル犬を用いた実験はハムリー（株）に委託した。

【2】*In vitro* 溶解実験

(1) 各溶媒の調製

・ human FaSSIF

| | |
|--------------|---------|
| タウロコール酸ナトリウム | 3 mM |
| 卵黄レシチン | 0.75 mM |
| TM | 適量 |
| pH | 6.5 |

・ dog FaSSIF

| | |
|--------------|---------|
| タウロコール酸ナトリウム | 5 mM |
| 卵黄レシチン | 1.25 mM |
| TM | 適量 |
| pH | 6.5 |

• rat FaSSIF

| | |
|--------------|--------|
| タウロコール酸ナトリウム | 50 mM |
| 卵黄レシチン | 3.7 mM |
| TM | 適量 |
| pH | 6.5 |

(2) 実験手順

過剰量の ATV を各溶媒に添加し、37°Cで 2 時間攪拌した。その後、各溶液を 0.45 μ m のフィルターでろ過し、溶解濃度測定サンプルとした。

【3】ラット、イヌでの安定同位体 *iv* 法を用いた薬物動態実験

(1) 試薬の調製

ラット

リピトール錠®を乳鉢・乳棒を用いて粉碎し、ATV として 0.25 mg/mL (コントロール群) および 0.5 mg/mL (CsA 併用群) となるように精製水に懸濁し、経口投与液とした。ATV-d5 は 1 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈して 0.01 mg/mL とした。ネオーラル内用液 10%は 52 μ L/mL になるように精製水に分散させ、経口投与液とした。

イヌ

同様にリピトール錠®を粉碎し、ATV として 0.1 mg/mL (コントロール群) および 0.11 mg/mL (CsA 併用群) となるように精製水に懸濁し、経口投与液とした。ATV-d5 は 1 mg/mL の DMSO 溶液を生理食塩水で希釈して 0.05 mg/mL とした。ネオーラル内用液 10%は 104 μ L/mL になるように精製水に分散させ、経口投与液とした。

(2) 実験手順

コントロール群 (ATV 0.5mg/kg)、CsA 併用群 (ATV 0.5 mg/kg, CsA 5.2 mg/kg)の 2 群で実験を行った。

ラット

ラット 8 匹を 4 匹ずつ 2 群にわけた。コントロール群では ATV 投与液をゾンデ

を用いてラットに経口投与した (2 mL/kg)。CsA 併用群では、CsA 投与液を経口投与後 (1 mL/kg)、ATV 投与液をただちに経口投与した (1 mL/kg)。両群とも、経口投与 90 分後 ATV-d5 投与液を頸静脈から急速投与した。経口投与後の採血、サンプル処理は、第 1 章 【3】 (2)参照。

イヌ

1 才令の雄性のビーグル犬を 4 匹用意し、コントロール群の実験を行った後 1 週間の wash out 期間を設け、同じ個体で CsA 併用群の実験を行った。コントロール群では、イヌにシリンジとカテーテルを用いて ATV 投与液を経口投与した。CsA 併用群では、まず CsA 投与液を経口投与した後、ただちに ATV 投与液を経口投与した。両群とも、カテーテル内に残った投与液を精製水 5 mL で流し込んだ。経口投与 90 分後、橈側皮静脈より ATV-d5 を急速投与した。経口投与後 15, 30, 45, 60, 95, 100, 120, 180, 240 分に橈側皮静脈から採血した。サンプル処理はラットと同様。

(3) 血漿サンプル処理

第 1 章 【3】 (3) 参照。

【4】 薬物の定量

第 1 章と同様、LC/MS/MS (ACQUITY®UPLC, Waters)により定量した。

CsA

<LC condition>

VER と同様。

<MS/MS condition>

Ionization: Electrospray positive mode

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone voltage: 50 V

Collision energy: 30 eV

Parent m/z: 1203.991

Daughter m/z: 1185.2935

ATV, ATV-d5

第 2 章 【7】 参照。

【5】 薬物動態解析

第 1 章 【8】 参照。

【6】 統計解析

第 1 章 【9】 参照。

引用文献

- 1) Prueksaritanont T, Tatosian DA, Chu X, Railkar R, Evers R, Chavez-Eng C, Lutz R, Zeng W, Yabut J, Chan GH, Cai X, Latham AH, Hehman J, Stypinski D, Brejda J, Zhou C, Thornton B, Bateman KP, Fraser I, Stoch SA. Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Apr; 101(4):519-530. doi: 10.1002/cpt.525. Epub 2016 Dec 10.
- 2) Mao ZL, Alak A, Wheeler JJ, Keirns J. Disposition and mass balance of [¹⁴C] vernakalant after single intravenous and oral doses in healthy volunteers. *Drug Metab Lett.* 2011 Apr; 5(2):114-25.
- 3) Deng Y, Sychterz C, Suttle AB, Dar MM, Bershas D, Negash K, Qian Y, Chen EP, Gorycki PD, Ho MY. Bioavailability, metabolism and disposition of oral pazopanib in patients with advanced cancer. *Xenobiotica.* 2013 May; 43(5):443-53. doi: 10.3109/00498254.2012.734642. Epub 2012 Nov 16.
- 4) Yamashita S, Kataoka M, Suzaki Y, Imai H, Morimoto T, Ohashi K, Inano A, Togashi K, Mutaguchi K, Sugiyama Y. An Assessment of the Oral Bioavailability of Three Ca-Channel Blockers Using a Cassette-Microdose Study: A New Strategy for Streamlining Oral Drug Development. *J Pharm Sci.* 2015 Sep; 104(9):3154-61. doi: 10.1002/jps.24499. Epub 2015 Jun 2.
- 5) 動物実験の適正な使用に向けたガイドライン
- 6) Ichinose R, Kurihara N. Intramolecular deuterium isotope effect and enantiotopic differentiation in oxidative demethylation of chiral [monomethyl-d₃] methoxychlor in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1987 Nov 1; 36(21):3751-6.
- 7) Sanderson K. Physiology: Emissions control. *Nature.* 2009 May 28; 459(7246):500-2. doi: 10.1038/459500a.
- 8) ミカルデイス錠®インタビューフォーム (日本ベーリンガーインゲルハイム (株))
- 9) Yamada A, Maeda K, Ishiguro N, Tsuda Y, Igarashi T, Ebner T, Roth W, Ikushiro S, Sugiyama Y. The impact of pharmacogenetics of metabolic enzymes and transporters on the pharmacokinetics of telmisartan in healthy volunteers. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Sep; 21(9):523-30. doi:

- 10.1097/FPC.0b013e3283482502. PMID: 21829131.
- 10) Stewart BH, Kugler AR, Thompson PR, Bockbrader HN. A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. *Pharm Res.* 1993 Feb; 10(2):276-81.
 - 11) Sato M, Toshimoto K, Tomaru A, Yoshikado T, Tanaka Y, Hisaka A, Lee W, Sugiyama Y. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Bosentan Identifies the Saturable Hepatic Uptake As a Major Contributor to Its Nonlinear Pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos.* 2018 May; 46(5):740-748. doi: 10.1124/dmd.117.078972. Epub 2018 Feb 23.
 - 12) Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Aug; 46(8):2546-53.
 - 13) Frey N, Grange S, Woodworth T. Population pharmacokinetic analysis of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol.* 2010 Jul; 50(7):754-66. doi: 10.1177/0091270009350623. Epub 2010 Jan 23.
 - 14) Yoshida T, Fukami T, Kurokawa T, Gotoh S, Oda A, Nakajima M. Difference in substrate specificity of carboxylesterase and arylacetamide deacetylase between dogs and humans. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Jan 1; 111:167-176. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.040. Epub 2017 Sep 28.
 - 15) Jones R, Marschmann M, Keller M, Qiu NH, Fowler S, Singer T, Schuler F, Funk C, Schadt S. Shedding light on minipig drug metabolism - elevated amide hydrolysis in vitro. *Xenobiotica.* 2016; 46(6):483-94. doi: 10.3109/00498254.2015.1089452. Epub 2015 Sep 25.
 - 16) Stangier J, Su CA, Schöndorfer G, Roth W. Pharmacokinetics and safety of intravenous and oral telmisartan 20 mg and 120 mg in subjects with hepatic impairment compared with healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2000 Dec; 40(12 Pt 1):1355-64.
 - 17) Tatami S, Sarashina A, Yamamura N, Igarashi T, Tanigawara Y. Population pharmacokinetics of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in healthy volunteers and hypertensive patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2003;

- 18(3):203-11.
- 18) Kataoka M, Takashima T, Shingaki T, Hashizume Y, Katayama Y, Wada Y, Oh H, Masaoka Y, Sakuma S, Sugiyama Y, Yamashita S, Watanabe Y. Dynamic analysis of GI absorption and hepatic distribution processes of telmisartan in rats using positron emission tomography. *Pharm Res.* 2012 Sep;29(9):2419-31. doi:10.1007/s11095-012-0768-7.
 - 19) Takashima T, Hashizume Y, Katayama Y, Murai M, Wada Y, Maeda K, Sugiyama Y, Watanabe Y. The involvement of organic anion transporting polypeptide in the hepatic uptake of telmisartan in rats: PET studies with [¹¹C] telmisartan. *Mol Pharm.* 2011 Oct 3; 8(5):1789-98. doi: 10.1021/mp200160t.
 - 20) Stangier J, Schmid J, Türck D, Switek H, Verhagen A, Peeters PA, van Marle SP, Tamminga WJ, Sollie FA, Jonkman JH. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [¹⁴C] telmisartan in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2000 Dec; 40(12 Pt 1):1312-22.
 - 21) ALTMAN PL, DITTMER DS. BIOLOGY DATA BOOK. AMRL-TR-64-100. AMRL TR. 1964 Oct: 1-631.
 - 22) Hosea NA, Collard WT, Cole S, Maurer TS, Fang RX, Jones H, Kakar SM, Nakai Y, Smith BJ, Webster R, Beaumont K. Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. *J Clin Pharmacol.* 2009 May; 49(5):513-33. doi:10.1177/0091270009333209.
 - 23) McClellan KJ, Markham A. Telmisartan. *Drugs.* 1998; 56(6):1039–1046. doi:10.2165/00003495-199856060-00007.
 - 24) Stangier J, Su CA, Roth W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. *J Int Med Res.* 2000; 28(4):149–167. doi:10.1177/147323000002800401.
 - 25) Sugano K. Estimation of effective intestinal membrane permeability considering bile micelle solubilisation. *Int J Pharm.* 2009 Feb 23; 368(1-2):116-22. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.001. Epub 2008 Oct 15.
 - 26) Wienen W, Entzeroth M, van Meel JA, et al. A Review on Telmisartan: a novel,

- longacting angiotensin 2 receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev.* 2000; 18(2): 127-154.
- 27) Bramer SL, Forbes WP. Relative bioavailability and effects of a high fat meal on single dose cilostazol pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37 Suppl 2:13–23. doi:10.2165/00003088-199937002-00002.
- 28) Yu LX. An integrated model for determining causes of poor oral drug absorption. *Pharm Res.* 1999; 16(12):1883–1887. doi:10.1023/a:1018911728161.
- 29) Higashino H, Hasegawa T, Yamamoto M, et al. In vitro-in vivo correlation of the effect of supersaturation on the intestinal absorption of BCS Class 2 drugs. *Mol Pharm.* 2014; 11(3):746–754. doi:10.1021/mp400465p.
- 30) Tanaka Y, Higashino H, Kataoka M, Yamashita S. In Vivo Fluid Volume in Rat Gastrointestinal Tract: Kinetic Analysis on the Luminal Concentration of Nonabsorbable FITC-Dextran After Oral Administration. *J Pharm Sci.* 2020 Mar 12:S0022-3549(20)30129-5. doi: 10.1016/j.xphs.2020.03.005. Epub ahead of print.
- 31) Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Saito A, Harada A, Ebner T, Roth W, Igarashi T, Sugiyama Y. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2006 Jul; 34(7):1109-15. doi: 10.1124/dmd.105.009175. Epub 2006 Apr 12.
- 32) Maeda K, Takano J, Ikeda Y, et al. Nonlinear pharmacokinetics of oral quinidine and verapamil in healthy subjects: a clinical microdosing study. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90(2):263–270. doi:10.1038/clpt.2011.108.
- 33) Wetterich U, Spahn-Langguth H, Mutschler E, Terhaag B, Rösch W, Langguth P. Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo. *Pharm Res.* 1996; 13(4):514–522. doi:10.1023/a:1016029601311.
- 34) Ishiguro N, Maeda K, Saito A, Kishimoto W, Matsushima S, Ebner T, Roth W, Igarashi T, Sugiyama Y. Establishment of a set of double transfectants coexpressing organic anion transporting polypeptide 1B3 and hepatic efflux transporters for the characterization of the hepatobiliary transport of telmisartan acylglucuronide. *Drug Metab Dispos.* 2008 Apr; 36(4):796-805. doi: 10.1124/dmd.107.018903. Epub 2008 Jan 7.
- 35) Furukawa T, Nakamori F, Tetsuka K, Naritomi Y, Moriguchi H, Yamano K,

- Terashita S, Teramura T. Quantitative prediction of intestinal glucuronidation of drugs in rats using in vitro metabolic clearance data. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27(2):171-80. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-11-rg-088. Epub 2011 Oct 4.
- 36) Nishino A, Kato Y, Igarashi T, Sugiyama Y. Both cMOAT/MRP2 and another unknown transporter(s) are responsible for the biliary excretion of glucuronide conjugate of the nonpeptide angiotensin II antagonist, telmisartan [published correction appears in *Drug Metab Dispos* 2001 Jan; 29(1):89]. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28(10):1146–1148.
- 37) Schwarz UI, Gramatté T, Krappweis J, Oertel R, Kirch W. P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000 Apr; 38(4):161-7. doi: 10.5414/cpp38161.
- 38) Ameer B, Weintraub RA. Drug interactions with grapefruit juice. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Aug; 33(2):103-21. doi: 10.2165/00003088-199733020-00003.
- 39) Fromm MF, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology.* 1996 Oct; 24(4):796-801. doi: 10.1002/hep.510240407.
- 40) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev.* 1998 Sep; 50(3):387-412. Review.
- 41) Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 2004 Nov; 32(11):1201-8. Epub 2004 Aug 10. Review.
- 42) Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos.* 2006 May; 34(5):880-6.
- 43) Topletz AR, Dennison JB, Barbuch RJ, Hadden CE, Hall SD, Renbarger JL. The relative contributions of CYP3A4 and CYP3A5 to the metabolism of vinorelbine. *Drug Metab Dispos.* 2013 Sep; 41(9):1651-61. doi: 10.1124/dmd.113.051094.

- 44) Shitara Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011 Jun; 26(3):220-7. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-094. Epub 2011 Feb 1.
- 45) Gessner A, König J, Fromm MF. Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 Jun; 105(6):1386-1394. doi: 10.1002/cpt.1360. Epub 2019 Mar 18.
- 46) Ivanyuk A, Livio F, Biollaz J, Buclin T. Renal Drug Transporters and Drug Interactions. *Clin Pharmacokinet.* 2017 Aug; 56(8):825-892. doi: 10.1007/s40262-017-0506-8.
- 47) Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, Tamai I. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One.* 2012; 7(2):e30456. doi: 10.1371/journal.pone.0030456. Epub 2012 Feb 10.
- 48) Breedveld P, Beijnen JH, Schellens JH. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Jan; 27(1):17-24. doi: 10.1016/j.tips.2005.11.009. Epub 2005 Dec 5.
- 49) Maeda K. Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(2):155-68. doi: 10.1248/bpb.b14-00767.
- 50) Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Feb; 304(2):610-6.
- 51) Ito S, Kusuhara H, Yokochi M, Toyoshima J, Inoue K, Yuasa H, Sugiyama Y. Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Feb; 340(2):393-403. doi:10.1124/jpet.111.184986.
- 52) Strelevitz TJ, Foti RS, Fisher MB. In vivo use of the P450 inactivator 1-aminobenzotriazole in the rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance. *J Pharm Sci.* 2006 Jun; 95(6):1334-41.

- 53) Sun Q, Harper TW, Dierks EA, Zhang L, Chang S, Rodrigues AD, Marathe P. 1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase. *Drug Metab Dispos.* 2011 Sep; 39(9):1674-9. doi: 10.1124/dmd.111.039834.
- 54) Manitpisitkul P, Chiou WL. Intravenous verapamil kinetics in rats: marked arteriovenous concentration difference and comparison with humans. *Biopharm Drug Dispos.* 1993 Oct; 14(7):555-66. doi: 10.1002/bdd.2510140702.
- 55) イトリゾールカプセル 50[®] 添付文書 (ヤンセンファーマ (株))
- 56) Shimizu M, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Effects of itraconazole and diltiazem on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol.* 2006 May; 61(5):538-44.
- 57) Estudante M, Maya M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Effect of P-glycoprotein on the rat intestinal permeability and metabolism of the BDDCS class 1 drug verapamil. *Mol Pharm.* 2013 Nov 4; 10(11):4038-45. doi: 10.1021/mp400381p. Epub 2013 Sep 27.
- 58) Ahonen J, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Effect of itraconazole and terbinafine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1995 Sep; 40(3):270-2.
- 59) U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Drug interaction studies-study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. Silver Spring, MD: FDA; 2012.
- 60) Backman JT, Luurila H, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Aug; 78(2):154-67.
- 61) Maeda K, Ikeda Y, Fujita T, Yoshida K, Azuma Y, Haruyama Y, Yamane N, Kumagai Y, Sugiyama Y. Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Oct; 90(4):575-81. doi: 10.1038/clpt.2011.142.
- 62) Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Kanamaru H, Saito Y, Hu Z, Sugiyama Y. Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab Dispos.* 2010 Feb;

- 38(2):215-22. doi: 10.1124/dmd.109.030254. Epub 2009 Oct 29.
- 63) Zhang W, Xiong X, Chen L, Liu M, Xiong Y, Zhang H, Huang S, Xia C. Hepatic Uptake Mechanism of Ophiopogonin D Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptides. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017 Aug; 42(4):669-676. doi: 10.1007/s13318-016-0384-8.
- 64) Izumi S, Nozaki Y, Maeda K, Komori T, Takenaka O, Kusuhara H, Sugiyama Y. Investigation of the impact of substrate selection on in vitro organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2015 Feb; 43(2):235-47. doi: 10.1124/dmd.114.059105. Epub 2014 Nov 20.
- 65) Ulvestad M, Skottheim IB, Jakobsen GS, Bremer S, Molden E, Asberg A, Hjelmæsæth J, Andersson TB, Sandbu R, Christensen H. Impact of OATP1B1, MDR1, and CYP3A4 expression in liver and intestine on interpatient pharmacokinetic variability of atorvastatin in obese subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Mar; 93(3):275-82. doi: 10.1038/clpt.2012.261.
- 66) Li J, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, Hidalgo IJ. Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the in vitro efflux of statin drugs. *Drug Metab Dispos.* 2011 Jul; 39(7):1196-202. doi: 10.1124/dmd.111.038075.
- 67) Tsamandouras N, Guo Y, Wendling T, Hall S, Galetin A, Aarons L. Modelling of atorvastatin pharmacokinetics and the identification of the effect of a BCRP polymorphism in the Japanese population. *Pharmacogenet Genomics.* 2017 Jan; 27 (1):27-38. doi: 10.1097/FPC.0000000000000252.
- 68) Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb; 316(2):762-71.
- 69) Wilkins JJ, Savic RM, Karlsson MO, Langdon G, McIlleron H, Pillai G, Smith PJ, Simonsson US. Population pharmacokinetics of rifampin in pulmonary tuberculosis patients, including a semimechanistic model to describe variable absorption. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun; 52(6):2138-48. doi: 10.1128/AAC.00461-07.
- 70) Asberg A, Hartmann A, Fjeldså E, Bergan S, Holdaas H. Bilateral

- pharmacokinetic interaction between cyclosporine A and atorvastatin in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2001 Nov; 1(4):382-6. doi: 10.1034/j.1600-6143.2001.10415.x.
- 71) Hedman M, Neuvonen PJ, Neuvonen M, Holmberg C, Antikainen M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients on a regimen of triple immunosuppression. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jan; 75(1):101-9. doi: 10.1016/j.clpt.2003.09.011.
- 72) Mück W, Mai I, Fritsche L, Ochmann K, Rohde G, Unger S, Johne A, Bauer S, Budde K, Roots I, Neumayer HH, Kuhlmann J. Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 1999 Mar; 65(3):251-61. doi: 10.1016/S0009-9236(99)70104-9.
- 73) Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CD, Windass AS, Schneck DW. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Aug; 76(2):167-77. doi: 10.1016/j.clpt.2004.03.010.
- 74) Hirata-Koizumi M, Saito M, Miyake S, Hasegawa R. [Incremental effect and mechanism of cyclosporine on blood concentration of statins and statin package insert information in Japan]. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*. 2005; (123):37-40. Japanese.
- 75) Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem*. 1999 Dec 24; 274(52):37161-8. doi: 10.1074/jbc.274.52.37161.
- 76) Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T, Nishimura K. Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jun; 297(3):861-7.
- 77) Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K. Functional

- characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Jul; 15(7):513-22. doi: 10.1097/01.fpc.0000170913.73780.5f.
- 78) Stern RH, Yang BB, Horton M, Moore S, Abel RB, Olson SC. Renal dysfunction does not alter the pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction of atorvastatin. *J Clin Pharmacol*. 1997 Sep; 37(9):816-9. doi: 10.1002/j.1552-4604.1997.tb05629.x.
- 79) Tanaka Y, Hara T, Waki R, Nagata S. Regional differences in the components of luminal water from rat gastrointestinal tract and comparison with other species. *J Pharm Pharm Sci*. 2012; 15(4):510-8. doi: 10.18433/j3f602.
- 80) Matsumura N, Yamaura Y, Katagi J, Ono S, Kim S, Yamashita S, Sugano K. Evaluation of Using Dogs to Predict Fraction of Oral Dose Absorbed in Humans for Poorly Water-Soluble Drugs. *J Pharm Sci*. 2018 Sep; 107(9):2489-2496. doi: 10.1016/j.xphs.2018.05.016. Epub 2018 Jun 1.
- 81) Hermann M, Asberg A, Christensen H, Holdaas H, Hartmann A, Reubsaet JL. Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 76(4):388–391. doi:10.1016/j.clpt.2004.07.008.
- 82) リピトール（アトルバスタチンカルシウム水和物）に関する資料（ワーナー・ランバート（株）／山之内製薬（株））
- 83) Gibson DM, Stern RH, Abel RB, Whitfield LR. Absolute bioavailability of atorvastatin in man. *Pharmaceutical Research*. 1997; 14(11 Suppl.): S253.
- 84) Kusuhara H, Sugiyama Y. In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009; 24(1):37-52. Review.
- 85) Wang L, Prasad B, Salphati L, Chu X, Gupta A, Hop CE, Evers R, Unadkat JD. Interspecies variability in expression of hepatobiliary transporters across human, dog, monkey, and rat as determined by quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos*. 2015 Mar;43(3):367-74. doi: 10.1124/dmd.114.061580. Epub 2014 Dec 22.
- 86) Abdullahi W, Brzica H, Hirsch NA, Reilly BG, Ronaldson PT. Functional

- Expression of Organic Anion Transporting Polypeptide 1a4 Is Regulated by Transforming Growth Factor- β /Activin Receptor-like Kinase 1 Signaling at the Blood-Brain Barrier. *Mol Pharmacol.* 2018 Dec; 94(6):1321-1333. doi: 10.1124/mol.118.112912. Epub 2018 Sep 27.
- 87) Brzica H, Abdullahi W, Reilly BG, Ronaldson PT. Sex-specific differences in organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) functional expression at the blood-brain barrier in Sprague-Dawley rats. *Fluids Barriers CNS.* 2018 Sep 13; 15(1):25. doi: 10.1186/s12987-018-0110-9.
- 88) Kellick KA, Bottorff M, Toth PP, The National Lipid Association's Safety Task Force. A clinician's guide to statin drug-drug interactions. *J Clin Lipidol.* 2014 May-Jun; 8(3 Suppl):S30-46. doi: 10.1016/j.jacl.2014.02.010.
- 89) Kageyama M, Namiki H, Fukushima H, Ito Y, Shibata N, Takada K. In vivo effects of cyclosporin A and ketoconazole on the pharmacokinetics of representative substrates for P-glycoprotein and cytochrome P450 (CYP) 3A in rats. *Biol Pharm Bull.* 2005 Feb; 28(2):316-22.
- 90) Mendes J, Martinho A, Simoes O, Mota A, Breitenfeld L, Pais L. Genetic polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 genes and their correlations with plasma levels of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2009 Apr; 41(3):840-2. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.01.050. PMID: 19376366.
- 91) Katsuyama Y, Ota M, Mizuki N, Ito A, Okada E, Ohno S, Matsunaga T, Fukushima H, Ohmori S. MDR1 polymorphisms effect cyclosporine AUC0-4 values in Behçet's disease patients. *Clin Ophthalmol.* 2007 Sep; 1(3):297-303.
- 92) Tabata K, Yamaoka K, Kaibara A, Suzuki S, Terakawa M, Hata T. Moment Analysis Program available on Microsoft Excel®. *Xenobio. Metabo. and Dispos.* 1999, 14(4), 286-293.